



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS
Y BIOTECNOLOGÍA



CARRERA DE ALIMENTOS

Evaluación fisicoquímica y cinética de producción de biomasa de dos tipos de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus* en la fermentación alcohólica de una bebida a base de mandarina (*Citrus reticulata*) y cidra (*Sechium edule*).

Informe Final de Integración Curricular, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingeniera en Alimentos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología

Autora: Yadira Alexandra Vallejo Orozco

Tutora: MSc. María Daniela Garcés Moncayo

Ambato – Ecuador

Marzo – 2023

APROBACIÓN DEL TUTOR

MSc. María Daniela Garcés Moncayo

Certifica:

Que el presente Informe Final de Integración curricular ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final de Integración Curricular, bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 14 de febrero del 2023

.....

MSc. María Daniela Garcés Moncayo

C.I 1803571585

TUTORA

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Yadira Alexandra Vallejo Orozco, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos, son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las citas bibliográficas



Yadira Alexandra Vallejo Orozco

C.I: 1850132133

Autora

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato. Para constancia firman:

.....

Presidente del Tribunal

.....

PhD. Liliana Alexandra Cerda Mejía

C.I. 1804148086

.....

Mg. Ruth Narcisa Pérez Salinas

C.I. 1802726628

Ambato, 16 de marzo del 2022

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final de Integración Curricular o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final de Integración Curricular, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Yadira Alexandra Vallejo Orozco

C.I: 1850132133

Autora

DEDICATORIA

A mis padres, Gladys Orozco y Gustavo Vallejo que siempre me apoyaron en todo momento de manera emocional, moral y económica y se convirtieron en un pilar indispensable en mi vida.

A mi hermana, que de una u otra manera me alentaba a continuar adelante

A las personas y amigos quienes me apoyaron de todas las formas posibles durante mis años de estudio y mi trabajo final

A mi compañero fiel, mi perrito Willy que ha vivido tantos años conmigo y ha sido motivo de mi felicidad

AGRADECIMIENTOS

A la vida, por darme la oportunidad de seguir y culminar una carrera. A mis padres Gladys y Gustavo que siempre estuvieron conmigo en cada etapa buena y mala de mi vida, a mi hermana Jessica que siempre he considerado un modelo a seguir, a mis amigos de la Facultad que estuvieron ahí en los buenos y malos momentos, especialmente a José y a Dennys que conozco desde los primeros años universitarios. A mi amiga/prima Melanie que se ha convertido en un apoyo incondicional en los últimos semestres.

A mi tutora, MSc. María Daniela Garcés que con su dedicación me ha ayudado en este último peldaño de la carrera. A mis maestros y profesores que durante estos años han compartido sus más grandes virtudes, conocimientos y experiencias que me han fortalecido e inspirado.

A la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología por brindarme un espacio dentro de sus aulas y a la Universidad Técnica de Ambato por abrirme sus puertas para mi anhelada formación académica.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	iv
DERECHOS DE AUTOR	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Antecedentes Investigativos	1
1.1.1. Mandarina	2
1.1.1.1. Taxonomía de la mandarina.....	2
1.1.1.2. Composición nutricional.....	3
1.1.1.3. Producción de mandarina en Ecuador.....	4
1.1.2. Cidra.....	5
1.1.2.1. Taxonomía de la cidra o chayote	5
1.1.2.2. Composición nutricional.....	5
1.1.2.3. Producción de cidra en Ecuador	6
1.1.3. Levaduras	7
1.1.3.1. Condiciones físicas óptimas de desarrollo de levaduras	8
1.1.3.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
1.1.3.3. <i>Saccharomyces bayanus</i>	9
1.1.4. Fermentación.....	9
1.1.4.1. Fermentación alcohólica.....	10
1.1.5. Bebidas alcohólicas fermentadas de frutas	10
1.1.5.1. Requisitos de vinos de frutas	11
1.1.6. Parámetros para medir la fermentación alcohólica	11
1.1.6.1. Curva de crecimiento celular	11
1.1.6.2. Cinética de crecimiento microbiano	12
1.1.6.3. Acidez Total	13

1.1.6.4.	Azúcares (Brix)	13
1.1.6.5.	Grado alcohólico	13
1.1.6.6.	Acidez volátil	14
1.1.6.7.	Metanol	14
1.2.	Objetivos	14
1.2.1.	Objetivo General	14
1.2.2.	Objetivos Específicos	15
1.3.	Hipótesis	15
1.3.1	Hipótesis nula.....	15
1.3.2.	Hipótesis alterna.....	15
1.4.	Señalamiento de las variables.....	16
1.4.1.	Variables independientes.....	16
1.4.2.	Variables dependientes.....	16
CAPÍTULO II		17
METODOLOGÍA		17
2.1.	Materiales.....	17
2.1.1.	Materia Prima.....	17
2.1.2.	Materiales de laboratorio y utensilios	17
2.1.3.	Equipos.....	18
2.1.4.	Reactivos.....	18
2.2.	Métodos.....	19
2.2.1.	Proceso tecnológico de la elaboración de la bebida fermentada	19
2.2.1.1.	Selección y lavado de la materia prima.....	20
2.2.1.2.	Extracción de zumos.....	20
2.2.1.3.	Caracterización fisicoquímica de los zumos	20
2.2.1.4.	Preparación de Mosto	21
2.2.1.5.	Preparación de levaduras e inoculación	21
2.2.1.6.	Fermentación	22
2.2.1.7.	Trasiego.....	22
2.2.1.8.	Filtrado	22
2.2.1.9.	Pasteurizado.....	22
2.2.1.10.	Embotellado.....	23
2.2.2.	Caracterización fisicoquímica de la bebida alcohólica	23
2.2.2.1.	Grado alcohólico	24
2.2.2.2.	Acidez volátil	24
2.2.2.3.	Metanol	24

2.2.3.	Cinética de producción de biomasa	25
2.2.3.1.	Población celular	25
2.2.4.	Tratamiento Estadístico	26
2.2.4.1.	Diseño Experimental	26
2.2.4.2.	Análisis Estadístico	28
CAPÍTULO III		29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		29
3.1.	Elaboración de la bebida alcohólica	29
3.1.1.	Caracterización fisicoquímica de las materias primas	31
3.1.2.	Variables medidas durante la etapa fermentativa.....	33
3.1.2.1.	Sólidos Solubles (Brix).....	33
3.1.2.2.	Potencial Hidrógeno (pH).....	34
3.1.2.3.	Acidez Total	36
3.1.2.4.	Conteo de cel/ ml durante la fermentación	38
3.1.3.	Cinética de producción de biomasa	39
3.1.3.1.	Concentración celular	39
3.1.3.2.	Cinética de producción de biomasa	40
3.1.4.	Análisis Fisicoquímico al final de la fermentación.....	42
3.1.4.1.	Alcohol.....	42
3.1.4.2.	Acidez Volátil.....	43
3.1.4.3.	Presencia de metanol	44
3.1.5.	Verificación de la hipótesis	45
CAPÍTULO IV		46
CONCLUSIONES		46
CAPITULO V		48
MATERIAL DE REFERENCIA		48
ANEXOS		58
A.	Datos Experimentales.....	58
B.	Resultados Estadísticos	66
C.	Cálculos	70
D.	Gráficos y figuras.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Precios nacionales promedios establecidos en mercados mayoristas (Quito, Ambato, Latacunga y Riobamba) de 2016 a 2017	4
Figura 2: Ubicación geográfica de los cultivos de cidra.....	7
Figura 3: Diagrama de proceso para el desarrollo de la bebida alcohólica	19
Figura D1: Obtención de materias primas (mandarina y cidra)	77
Figura D3: Caracterización fisicoquímica de zumo de mandarina y cidra.....	77
Figura D4: Mostos preparados.....	77
Figura D5: Activación de levaduras	77
Figura D6: Reposo de mostos y recolección diaria de muestras	77
Figura D7: Conteo de levaduras a diario	77
Figura D8: Análisis fisicoquímico de mostos a diario.....	77
Figura D9: Esterilización de botellas.....	78
Figura D10: Pasteurización lenta de las bebidas fermentadas	78
Figura D11: Bebida embotellada y etiquetada.....	78
Figura D12: Destilación alcohólica	78
Figura D13: Determinación de grado alcohólico.....	78
Figura D14: Equipo para destilación con arrastre de vapor para determinación de acidez volátil	78
Figura D15: Prueba cualitativa para metanol	78
Figura D16: Prueba negativa de presencia metanol, tratamiento $A_0B_0R_1$	78
Figura D17: Prueba positiva de presencia metanol, tratamiento $A_0B_0R_2$	79
Figura D18: Prueba positiva de presencia metanol, tratamiento $A_1B_0R_1$	79
Figura D19: Prueba negativa de presencia metanol, tratamiento $A_1B_0R_2$	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Descripción taxonómica de la mandarina.....	2
Tabla 2: Composición nutricional de mandarina	3
Tabla 3. Descripción taxonómica de la cidra	5
Tabla 4: Composición nutricional de la cidra	6
Tabla 5: Requisitos para vino de frutas, INEN 374	11
Tabla 6: Diseño A x B, para conocer la influencia de los factores en el pH, Brix, acidez total, grado alcohólico y cinética durante la fermentación	26
Tabla 7: ANOVA para el diseño factorial A x B con replicación	28
Tabla 8: Formulación para 2L de cada tratamiento de la bebida alcohólica.....	30
Tabla 9: Parámetros fisicoquímicos y rendimiento de la mandarina y cidra	31
Tabla 10: Resultados de la determinación cualitativa para presencia/ausencia de metanol en los mejores tratamientos	44
Tabla A1: Tratamientos Experimentales.....	58
Tabla A2: Comportamiento de Sólidos solubles en grados Brix durante los días de fermentación para cada uno de los tratamientos	59
Tabla A3: Comportamiento de Acidez en % de ácido tartárico durante los días de fermentación para cada uno de los tratamientos	60
Tabla A4: Comportamiento del pH durante los días de fermentación para cada uno de los tratamientos	61
Tabla A5: Células por mililitro durante los días de fermentación para cada uno de los tratamientos	62
Tabla. A6: Grado alcohólico (%) para cada uno de los tratamientos	63
Tabla A7: Acidez volátil (g. ácido acético/L) para cada uno de los tratamientos	63
Tabla A8: Ecuaciones de crecimiento de biomasa y velocidad máxima $\mu_{\text{máx}}$. en la fase exponencial para cada tratamiento.....	64
Tabla A9: Concentración de células de levadura (cel/ml)	64
Tabla A10: Cantidad de glucosa (g)	65

Tabla A11: Coeficientes de rendimiento de producción de biomasa ($Y_{M/S}$) y producción de etanol ($Y_{P/S}$).....	65
Tabla A12: Tiempos de Generación de todos los tratamientos.....	66
Tabla B1: ANOVA de la variable °Brix al final de la fermentación	66
Tabla B2: ANOVA de la variable pH al final de la fermentación.....	67
Tabla B3: Subconjuntos homogéneos del factor A de la variable pH	67
Tabla B4: ANOVA de la variable Acidez Total al final de la fermentación.....	67
Tabla B5: Subconjuntos homogéneos del factor A de la variable acidez.....	68
Tabla B6: ANOVA de la variable cel/ml al final de la fermentación.....	68
Tabla B7: Subconjuntos homogéneos del factor A de la variable cel/ml	68
Tabla B8: ANOVA de la variable Alcohol.....	69
Tabla B10: ANOVA de variable Acidez Volátil	69
Tabla C1: Ajuste de °Brix inicial.....	70

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Comportamiento de azúcares (Brix) respecto al tiempo para todos los tratamientos	34
Gráfico 2: Comportamiento del pH respecto al tiempo para todos los tratamientos	35
Gráfico 3: Comportamiento de la acidez total respecto al tiempo para todos los tratamientos	37
Gráfico 4: Comportamiento de cel/ml respecto al tiempo a. <i>S. cerevisiae</i> , b. <i>S. bayanus</i>	38
Gráfico 5: Porcentaje de alcohol etílico producido para cada tratamiento	42
Gráfico 6: Acidez volátil de los tratamientos.....	43
Gráfico D1: Crecimiento del logaritmo de biomasa y reducción de sólidos solubles (°Brix) de <i>S. cerevisiae</i> en mosto 75:25 cidra-mandarina, tratamiento A ₀ B ₀ R ₁	71
Gráfico D2: Crecimiento del logaritmo de biomasa y reducción de sólidos solubles (°Brix) de <i>S. cerevisiae</i> en mosto 75:25 cidra-mandarina, tratamiento A ₀ B ₀ R ₂	71
Gráfico D3: Crecimiento del logaritmo de biomasa y reducción de sólidos solubles (°Brix) de <i>S. cerevisiae</i> en mosto 50:50 cidra-mandarina, tratamiento A ₁ B ₀ R ₁	72
Gráfico D4: Crecimiento del logaritmo de biomasa y reducción de sólidos solubles (°Brix) de <i>S. cerevisiae</i> en mosto 50:50 cidra-mandarina, tratamiento A ₁ B ₀ R ₂	72
Gráfico D5: Crecimiento del logaritmo de biomasa y reducción de sólidos solubles (°Brix) de <i>S. cerevisiae</i> en mosto 25:75 cidra-mandarina, tratamiento A ₂ B ₀ R ₁	73
Gráfico D6: Crecimiento del logaritmo de biomasa y reducción de sólidos solubles (°Brix) de <i>S. cerevisiae</i> en mosto 25:75 cidra-mandarina, tratamiento A ₂ B ₀ R ₂	73
Gráfico D7: Crecimiento del logaritmo de biomasa y reducción de sólidos solubles (°Brix) de <i>S. bayanus</i> en mosto 75:25 cidra-mandarina, tratamiento A ₀ B ₁ R ₁	74
Gráfico D8: Crecimiento del logaritmo de biomasa y reducción de sólidos solubles (°Brix) de <i>S. bayanus</i> en mosto 75:25 cidra-mandarina, tratamiento A ₀ B ₁ R ₂	74
Gráfico D9: Crecimiento del logaritmo de biomasa y reducción de sólidos solubles (°Brix) de <i>S. bayanus</i> en mosto 50:50 cidra-mandarina, tratamiento A ₁ B ₁ R ₁	75

Gráfico D10: Crecimiento del logaritmo de biomasa y reducción de sólidos solubles (°Brix) de <i>S. bayanus</i> en mosto 50:50 cidra-mandarina, tratamiento A ₁ B ₁ R ₂	75
Gráfico D11: Crecimiento del logaritmo de biomasa y reducción de sólidos solubles (°Brix) de <i>S. bayanus</i> en mosto 25:75 cidra-mandarina, tratamiento A ₂ B ₁ R ₁	76
Gráfico D12: Crecimiento del logaritmo de biomasa y reducción de sólidos solubles (°Brix) de <i>S. bayanus</i> en mosto 25:75 cidra-mandarina, tratamiento A ₂ B ₁ R ₂	76

RESUMEN

Las bebidas alcohólicas a partir de frutas se han popularizado en los últimos años. Este trabajo tiene como fin identificar la formulación óptima tanto en rendimiento alcohólico como en producción de biomasa de dos tipos de levadura *S. cerevisiae* y *S. bayanus*. Se prepararon 12 tratamientos a tres concentraciones de zumos de cidra y mandarina (75:25, 50:50, 25:75) para cada una de las levaduras. Durante la etapa fermentativa, los tratamientos fueron monitoreados en pH, acidez, Grados Brix y células por mililitro. Al final de la fermentación se obtuvo el porcentaje de etanol. Los resultados de la fermentación indicaron que los tratamientos A0B0R2 y A0B0R1 obtuvieron 9 y 10 por ciento de grado alcohólico respectivamente, en la acidez volátil el tratamiento A2B1R1 fue el único que sobrepasó el límite máximo permisible según la norma INEN 374 con un valor de 2.52 g Ácido acético por Litro. La determinación de metanol evidenció que los tratamientos A0B0R1 y A1B0R2 fueron negativos mientras que las muestras A0B0R2, A1B0R1, resultaron positivas para metanol. Al comparar la cinética de biomasa, se determinó que *S. bayanus* tiene una mayor producción de biomasa, mayor velocidad de crecimiento celular y menor tiempo de generación, mientras que *S. cerevisiae* produjo mayor porcentaje de etanol en la combinación de 75:25 cidra- mandarina. Por lo que en este estudio se determinó que el mejor el tratamiento para la producción de una bebida alcohólica a base de cidra y mandarina es el A0B0R1 al tener un porcentaje de etanol del 10 por ciento.

Palabras clave: Bebidas fermentadas, fermentación alcohólica, Cidra, Mandarina, *S. cerevisiae*, *S. bayanus*.

ABSTRACT

Alcoholic drinks made from fruit have become popular in recent years. The purpose of this work is to identify the optimal formulation both in alcoholic yield and in biomass production of two types of yeast *S. cerevisiae* and *S. bayanus*. 12 treatments were prepared at three concentrations of cidra and tangerine juices (75:25, 50:50, 25:75) for each of the yeasts. During the fermentative stage, the treatments were monitored for pH, acidity, Brix degrees and cells per milliliter. At the end of the fermentation the percentage of ethanol was obtained. The results of the fermentation indicated that the treatments A0B0R2 and A0B0R1 obtained 9 and 10 percent alcoholic strength respectively, in volatile acidity the A2B1R1 treatment was the only one that exceeded the maximum permissible limit according to the INEN 374 standard with a value of 2.52 g. Acetic acid per Liter. The methanol determination showed that the A0B0R1 and A1B0R2 treatments were negative while the A0B0R2 and A1B0R1 samples were positive for methanol. When comparing the biomass kinetics, it was determined that *S. bayanus* has a higher biomass production, faster cell growth rate and shorter generation time, while *S. cerevisiae* produced a higher percentage of ethanol in the combination of 75:25 cidra- tangerine. Therefore, in this study it was determined that the best treatment to produce an alcoholic beverage based on citron and tangerine is A0B0R1, as it has a percentage of ethanol of 10 percent.

Keywords: Fermented drinks, alcoholic fermentation, Cidra, Tangerine, *S. cerevisiae*, *S. bayanus*.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos

En los últimos años se ha popularizado la idea de generar bebidas alcohólicas a partir de frutas con el fin de evitar el desperdicio generado por los mercados, debido a la sobreproducción, estas bebidas son conocidas como “vinos de frutas”, pese a no llevar uva como sustrato principal (Salas-Millán et al., 2022). Se ha encontrado que la eficiencia de la fermentación con distintos tipos de frutas que perecen rápido ha sido favorable, generando un valor agregado a la materia prima que comúnmente no es bien acogida o que no tienen una transformación que le ayude a incrementar su valor económico (Gordillo-Vinueza et al., 2022).

La fermentación alcohólica es un proceso de hace siglos atrás, y ha sido utilizada en la obtención de varios productos alimentarios. Los fermentados a base de frutas o “vinos de frutas” realizados con diferentes cepas de levadura del género *Saccharomyces* se han presentado como una opción para el aprovechamiento de productos frutales de temporada, que en zonas tropicales tienden a generar pérdidas postcosecha debido al crecimiento productivo, por la diversificación de cultivos y por políticas económicas que se viven en el país (Ramírez & Arias, 2000).

En estudios efectuados con relación a la elaboración de bebidas alcohólicas con distintas frutas, se puede mencionar a Salazar (2010) quien utilizó manzanas para la elaboración de mostos y evaluó tres distintos tipos de levaduras, señala que obtuvo el mejor desempeño con *Saccharomyces bayanus* en el rendimiento final del producto que fue de 80,77% en mostos limpios y 51,37% en mostos con sólidos en suspensión.

Así mismo, Guerra (2014) indicó que en la producción de este tipo de bebida alcohólica pero utilizando borjón cumple con la normativa INEN 374 para vinos de frutas, en este experimento se utilizó levaduras vínicas y de panificación obteniendo 11.81 °GL y 11.75 °GL respectivamente de grado alcohólico; además en el estudio sensorial determinó buena aceptabilidad, dándole importancia al atributo “sabor a alcohol”.

En otro experimento ejecutado por **Kadge, Patil, & Sonkamble (2021)** demuestran que las mezclas de zumos de mandarina Nagpur y uva con la adición de miel como fuente de carbono, alcanzan un contenido de alcohol etílico de 11.85%, así como puntuaciones altas en la aceptabilidad sensorial en la proporción 80:20 de zumos de mandarina y uva respectivamente; sin embargo encontraron que se genera un decremento de etanol en la fase de almacenamiento debido a la interacción entre alcoholes y ácidos para la formación de ésteres.

1.1.1. Mandarina

La mandarina se encuentra dentro del grupo de cítricos de especies llamados mandarino, donde se puede diferenciar *Citrus reticulata*, *Citrus reshni*, *Citrus unshiu* e híbridos como *Citrus tangerina*; se extiende en las zonas tropicales desde el ecuador 23° latitud norte o 24° latitud sur, por lo que la calidad de la fruta varía dependiendo de la zona, por factores como los microclimas y la altitud geográfica, lo cual genera distintas variedades y estados de consumo de la fruta, esto ha conllevado a que la mandarina no siempre tenga el color amarillo – naranja característico que se observa al alcanzar el estado óptimo de maduración (**Miranda et al., 2020**).

1.1.1.1. Taxonomía de la mandarina

Tabla 1: Descripción taxonómica de la mandarina

Descripción	Denominación
Reino	Plantae
Subreino	Viridiplantae
División	Tracheophyta
Clase	Magnolipsida
Superorden	Rosanane
Orden	Sapindales
Familia	Rutaceae

Género *Citrus*

Especie *C. reticulata,*

Elaborado por: Vallejo, Y. **Adaptado de:** Integrated Taxonomic Information System (2023)

1.1.1.2. Composición nutricional

Tabla 2: Composición nutricional de mandarina

	Porción de 100 g
Energía (Kcal)	43
Proteínas (g)	0,8
Lípidos totales (g)	Tr
Hidratos de carbono (g)	9
Fibra (g)	1.9
Agua (g)	88.3
Calcio (mg)	36
Hierro (mg)	0,3
Yodo (mg)	Tr
Magnesio (mg)	11
Zinc (mg)	0,4
Sodio (mg)	2
Potasio (mg)	160
Fósforo (mg)	17,2
Selenio (µg)	Tr
Tiamina (mg)	0,07
Riboflavina (mg)	0,02
Equivalentes niacina (mg)	0,3
Vitamina B6 (mg)	0,07
Folatos (µg)	21
Vitamina C (mg)	35
Vitamina A (µg)	56
Vitamina D (µg)	0
Vitamina E (mg)	-

Elaborado por: Vallejo, Y. **Fuente:** (Fundación Española de Nutrición, 2013)

1.1.1.3. Producción de mandarina en Ecuador

La mandarina en el país se produce en distintas zonas, en la región Sierra está la mandarina pequeña (criolla de Patate) donde las áreas más adecuadas son las estribaciones de la cordillera y los valles secos; en zonas tropicales se dan las mandarinas grandes (manabita) y en las zonas subtropicales se encuentra comúnmente la mandarina roja o rosada (Stacey, 2014).

De acuerdo con el III Censo Nacional Agropecuario, la superficie ocupada por siembras de mandarina es de 4587 ha. de forma asociada y 2077 ha. como monocultivo (INEC, 2000). En el año 2017 la superficie de siembra nacional ha incrementado en un 4% por lo que la producción y el rendimiento aumentó en un 17% con respecto a 2016, pese al crecimiento de la cosecha se han generado pérdidas económicas por la alta producción de mandarinas en los meses de abril – septiembre, además factores como el cultivo no controlado, las plagas, las épocas de lluvias, entre otros; han generado caída del precios disminuyendo de 11.35 USD en 2016 a 9.40 USD en 2017, lo que representa el 21% de pérdida. (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2017).

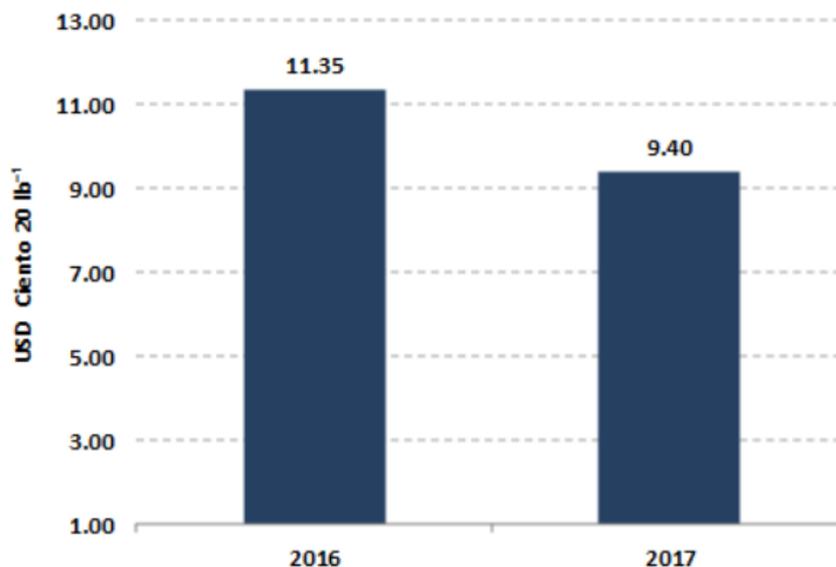


Figura 1. Precios nacionales promedios establecidos en mercados mayoristas (Quito, Ambato, Latacunga y Riobamba) de 2016 a 2017

Fuente: (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2017).

1.1.2. Cidra

La cidra o chayote es un fruto con similitud a la calabaza y pertenece a la familia *Cucurbitaceae*, es una planta trepadora y normalmente se aprovecha gran parte de ella, como el fruto, las raíces y las hojas (Baque & Bermeo, 2018; Moreira, 2018). Su cultivo puede darse durante cualquier época del año y su ciclo productivo es de tres años en promedio (Reyes, 2012). Este alimento es originario de los Andes y México y actualmente es producido y consumido mayormente en países de América Central (Baque & Bermeo, 2018).

1.1.2.1. Taxonomía de la cidra o chayote

Tabla 3. Descripción taxonómica de la cidra

Descripción	Denominación
Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Dilleniidae
Orden	Cucurbitales
Familia	Cucurbitaceae
Subfamilia	Cucurbitoideae
Tribu	Sicyeae
Subtribu	Sicyinae
Género	<i>Sechium</i>
Especie	<i>Sechium edule</i> (Jacq.) Sw.

Elaborado por: Vallejo, Y. **Adaptado de:** (Moreira, 2018)

1.1.2.2. Composición nutricional

Tabla 4: Composición nutricional de la cidra

	Porción de 100 g
Energía (Kcal)	19
Carbohidratos (g)	4,51
Almidones (g)	0,20
Fibra (g)	1,70
Lípidos	0,13
Proteínas (g)	0,82
Vitaminas	
Tiamina (mg)	0,03
Riboflavina (mg)	0,03
Niacina (mg)	0,47
Ácido pantoténico (mg)	0,25
Ácido fólico (µg)	93
Vitamina C (mg)	7,70
Vitamina A (UI)	56
Vitamina E (mg)	0,12
Vitamina K (µg)	4,10
Cenizas	
Sodio (mg)	2
Calcio (mg)	17
Magnesio (mg)	12
Fósforo (mg)	18
Potasio (mg)	125
Zinc (mg)	0,74
Manganeso (mg)	0,38

Elaborado por: Vallejo, Y. **Fuente:** (USDA, 2019).

1.1.2.3. Producción de cidra en Ecuador

Correa & Jara (2017) menciona que, en el país no existen datos para la cidra, pero se conoce que es un producto que está desde la pre-colonización y se ha aprovechado su fruto, las hojas tiernas y las raíces. Al no ser un cultivo importante, tiene poca acogida en los mercados nacionales. Sin embargo, se han encontrado cultivos en lugares no

específicos en las provincias del Oro, Bolívar, Orellana, Azuay y Tungurahua (Correa & Jara, 2017). En esta última, se encuentran en las zonas rurales de los distintos cantones como Baños, Pelileo y Patate.

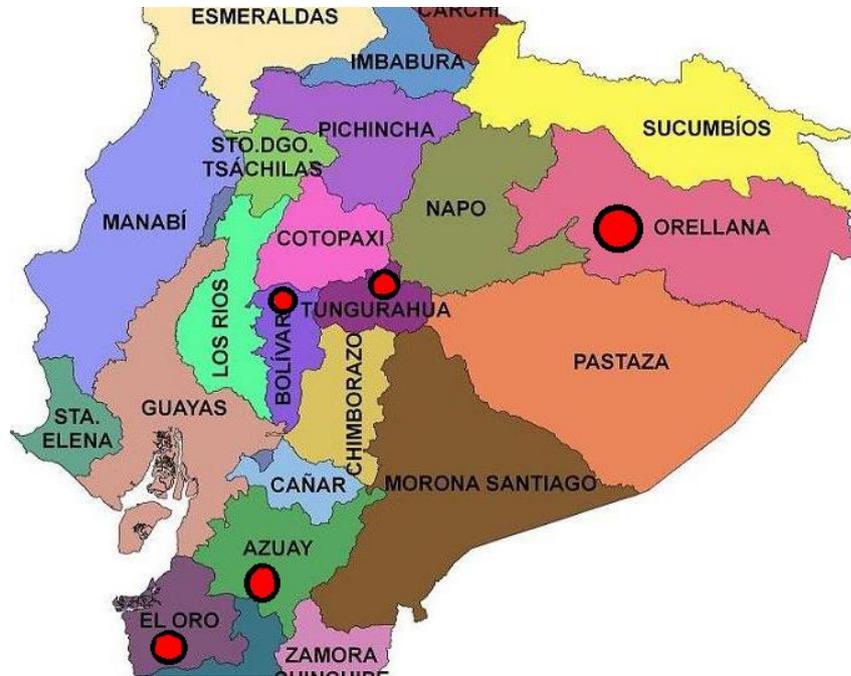


Figura 2: Ubicación geográfica de los cultivos de cidra.

Fuente:(Correa & Jara, 2017).

1.1.3. Levaduras

De acuerdo con **Montes de Oca et al. (2016)** las levaduras son hongos que se encuentran predominantemente en estado unicelular, son eucariotas y tienen características de resistencia frente a los agentes antibacterianos; su tamaño oscila entre 5 – 10 μm , siendo mayor al de las bacterias y su reproducción se da generalmente por gemación. Según **Viticulture & Enology (2016)** y **Kurtzman & Fell (1998)** citado por **Arias et al. (2019)** las levaduras tienen morfología globosa, elipsoide, ovoide y/o alargada, sin la presencia de producción de pseudohifas.

Levaduras del género *Saccharomyces* son de importancia industrial puesto que permiten obtener nuevos productos alimentarios fermentados como el pan, el vino, cerveza, etc. los cuales se han aprovechado desde siglos atrás.

1.1.3.1. Condiciones físicas óptimas de desarrollo de levaduras

Mayormente las especies de levadura se desarrollan eficientemente en ambientes cálidos, azucarados, diluidos y aeróbicos; su crecimiento está condicionado por factores como la temperatura (más baja 20 °C, más alta 50 °C), siendo la óptima 35 °C; el pH ideal se encuentra entre 4.5 y 6.5 dependiendo de las especies; la acidificación con ácidos orgánicos al medio inhiben el desarrollo de las levaduras debido a que pueden reducir el pH intracelular a través de la membrana de la levadura tras su translocación; la presencia de oxígeno en el medio es fundamental, pues mayormente son aerobias, ya que el O₂ es factor primordial en la biosíntesis de ácidos grasos de la membrana celular (Walker, 2009).

1.1.3.2. *Saccharomyces cerevisiae*

Este microorganismo es conocido como la “levadura de la cerveza” por su origen etimológico del griego *Saccharo* = azúcar, *myces* = hongo y *cerevisiae* = cerveza, pertenece a la familia *Saccharomycetaceae*, de la clase *Hemiascomycetes*. Al tener una tasa de crecimiento acelerado, sus cultivos son fáciles de mantener y pueden aislarse colonias fácilmente (Arias et al., 2019; Cirulli, 2018).

Dentro de los productos mayormente obtenidos empleando *S. cerevisiae* se encuentran las bebidas alcohólicas que se consiguen gracias al proceso de fermentación, donde, las levaduras inician con la glicólisis de la cual se consigue dos moléculas de piruvato de cada azúcar, este piruvato se descarboxila y se genera etanol y CO₂ (Zumárraga & Barbero, 2013). Las levaduras tienen como prioridad el consumo de moléculas de glucosa a mayor velocidad, que moléculas de fructosa, debido a que los transportadores celulares tienen afinidad por la glucosa de tal manera que se logran bebidas óptimas cuando se utiliza materias primas ricas en azúcares como fuentes de carbono.

Cabe destacar, que de acuerdo con las condiciones del medio, se generan rutas metabólicas distintas, lo cual lleva a la producción de metabolitos secundarios como el glicerol, ácido acético, ácidos orgánicos, entre otros que contribuyen a la calidad

sensorial de las bebidas producidas a partir de esta fermentación (**Zumárraga & Barbero, 2013**).

1.1.3.3. *Saccharomyces bayanus*

Al igual que *S. cerevisiae* previamente descrita, *Saccharomyces bayanus* es utilizada en la transformación de alimentos. Destacando en la producción de bebidas alcohólicas, se diferencia con *S. cerevisiae* por ser una levadura de vinificación con propiedades enológicas específicas (**Coronel, 2015**) que se relacionan con la actividad fermentativa de la levadura, tal como el poder fermentativo alusivo a la cantidad de alcohol generado y por tanto, resistencia al mismo del 16% alc/vol, la fuerza de fermentación que indica la velocidad a la que se inicia el proceso fermentativo, la resistencia a compuestos sulfurados para evitar problemas en la iniciación, así como los cambios de temperatura en un rango de 12 – 35 °C (**Miño et al. 2011; Polo, 2018**).

De igual manera, se consideran levaduras vínicas por los aportes en la calidad sensorial, que contribuyen al desarrollo de aromas por la liberación de terpenoides de la fruta }, y tioles volátiles, desarrollo de ésteres deseables, acidez en mayor o menor grado, mayor proporción de glicerol, entre otros (**Fleet, 2008**).

1.1.4. Fermentación

La fermentación es un proceso oxidativo de la materia orgánica para convertirla en energía (ATP) consumida por los mismos microorganismos, generando a la vez otros productos orgánicos aprovechables; se da principalmente por la acción de levaduras y en menor medida por algunas bacterias en ambientes anaerobios, el sustrato principal para dicho proceso son los carbohidratos fermentables; este bioproceso ha evolucionado en el desarrollo de varios alimentos como masas fermentadas para elaboración de pan, granos fermentados en la cerveza, fermentación de frutas para producir “vinos de frutas”, por nombrar algunos, lo cual ha permitido la conservación de las matrices alimentarias que tienden a perecer con el tiempo (**Puerta Quintero, 2010**).

1.1.4.1. Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica es una de las más conocidas implicadas en la transformación, conservación y estabilización de sustratos alimenticios ricos en azúcares como los jugos de frutas y/o verduras (Ciani et al., 2008). Se genera través de la descomposición de hexosas como la glucosa y fructosa presente en dichos alimentos de manera natural provocando la síntesis de productos como el etanol (Narvaez Guerrero, 2020).

Este tipo de fermentación empieza en con la vía glicolítica Embden – Meyerhof que forma el ácido pirúvico, seguido se descarboxila no oxidativamente el piruvato por labor de la enzima descarboxilasa pirúvica que produce acetaldehído y CO₂ a partir del requerimiento de TPP (tiaminpirofosfato) y Mg²⁺. A continuación, por la enzima alcohol deshidrogenasa se cataliza el acetaldehído que opera como aceptor de electrones de nicotinamadeninucleótido (NADH) reducido que produce etanol y NAD⁺ (Carbonero, 1975).



1.1.5. Bebidas alcohólicas fermentadas de frutas

Se trata de bebidas obtenidas a través de la fermentación de los azúcares de ciertas frutas, granos o raíces para obtener alcohol etílico con una concentración entre 5 – 15 °GL (Ulloa, 2015). De acuerdo con la norma **INEN 374** se clasifican conforme al azúcar añadida y gases disueltos al final de la fermentación en:

- **Vino seco de frutas:** Se determina como vino seco a aquellos que después de la fermentación contienen un máximo de 25 g/L de azúcares (NTE INEN 374, 2016). De acuerdo con Garcés (2013) contienen < 5 g/L azúcares.
- **Vino semidulce (semiseco) de frutas:** Se trata de aquellos que contienen 30 – 50 g/L azúcares (Garcés, 2013).
- **Vino dulce de frutas:** Son vinos frutales con una concentración de azúcares mayores a 50,1 g/L (NTE INEN 374, 2016).

- **Vino espumoso (espumante) de frutas:** Trata de vinos con espumabilidad natural generada por la presencia de CO₂, mínima de 300 kPa (NTE INEN 374, 2016).
- **Vino gasificado (carbonatado) de frutas:** De acuerdo con normativa se les llama así, cuando presentan un máximo de 350 kPa en contenido de CO₂ (NTE INEN 374, 2016).

1.1.5.1. Requisitos de vinos de frutas

Las bebidas alcohólicas fermentadas a base de frutas se conocen como “vino de frutas” de acuerdo con la normativa ecuatoriana. NTE INEN 374, 2016.

Tabla 5: Requisitos para vino de frutas, INEN 374

Requisitos	Unidades	Mínimo	Máximo
Alcohol	%	6,0	-
Acidez volátil	g/L	-	1,5
Acidez total	g/L	3,5	-
Anhidrido sulfuroso	mg/L	-	400,0
Metanol	mg/L	-	1000,0

Fuente: NTE INEN 374

1.1.6. Parámetros para medir la fermentación alcohólica

1.1.6.1. Curva de crecimiento celular

La cinética celular se desarrolla en todos los microorganismos, se diferencian distintas etapas que se representan como el logaritmo del número de bacterias por unidad de tiempo (Winn et al., 2006).

La fase de latencia o fase lag, es aquella donde los microorganismos se adaptan a las condiciones del medio, en ésta las células sintetizan enzimas, metabolitos, cofactores

y demás que permiten la estabilización de los depósitos intracelulares de nutrientes **(Winn et al., 2006)**.

La fase de crecimiento progresivo se da mientras las velocidades de reacción enzimáticas se acercan al estado estacionario **(Winn et al., 2006)**. Continuando, la fase de crecimiento exponencial o fase logarítmica es aquella donde los microorganismos ya se encuentran adaptados al medio y la división celular se da a las velocidades máximas, la población celular se desarrolla exponencialmente llevando a cabo el proceso fermentativo mientras consume los sustratos ricos en glucosa para producir etanol, esta fase se encuentra bajo condiciones de temperatura específicas para cada microorganismo, en el caso de levaduras alrededor de 35 °C, la fuente de carbono, la tensión del oxígeno, entre otros factores **(Blanco, 2016; Márquez, 2015; Winn et al., 2006)**.

Luego se encuentra la fase estacionaria, donde el número de células nuevas es igual al número de células muertas que ceden por la falta de nutrientes y por la concentración de sustancias que los microbios desechan, sin embargo, aún pueden presentar actividad celular y metabólica **(Blanco, 2016)**. Finalmente, la fase de muerte se da cuando ya no existe un estado de crecimiento y las células entran en un proceso de lisis y se genera por factores como el agotamiento de la fuente de nutrientes y energía **(Blanco, 2016; Stainer et al., 2005)**.

1.1.6.2. Cinética de crecimiento microbiano

La estequiometría del crecimiento microbiano presenta dificultades al enunciar a la biomasa como un compuesto químico, por lo que se recurre a expresarse como rendimientos ($Y_{X/S}$; $Y_{P/S}$) que permiten relacionar las cantidades de biomasa y producto con respecto a las cantidades de sustrato que se consuman, al tomar como punto de referencia el inicio y final del proceso fermentativo se puede calcular dichos rendimientos de la siguiente manera **(Castañeda, 2019; Constante, 2015)**.

$$Y_{\frac{x}{s}} = \frac{\text{Biomasa producida}}{\text{Masa sustrato consumido}} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f}$$

$$Y_{\frac{p}{s}} = \frac{\text{Producto producido}}{\text{Masa sustrato consumido}} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P_f}{S_0 - S_f}$$

1.1.6.3. Acidez Total

La acidez total es requerida para conocer el tipo de vino, cumplir con la normativa vigente o controlar la estabilidad; no tiene una relación directa con el pH por la variación de la capacidad tampón. (Tenorio Sanz et al., 2014). La acidez total se utiliza para enunciar el número de protones de los ácidos orgánicos que no se disocian presentes en el producto final, así como la equivalencia de protones de los aniones del ácido orgánico; en general expresa valores de cada ácido orgánico disociado o no a excepción del ácido carbónico y dióxido de azufre (Tsegay, 2020).

1.1.6.4. Azúcares (Brix)

Los grados Brix, es una variable que debe monitorearse durante la fermentación para conocer la evolución del sustrato frente al consumo de las levaduras. La concentración de azúcares determinará el grado alcohólico potencial que se obtendrá de la bebida una vez finalizada la fermentación; por lo que una alta concentración de azúcares de la fruta natural o añadidos bajo condiciones óptimas para la vinificación garantiza un alto contenido alcohólico en el producto final (Fredes et al., 2021).

1.1.6.5. Grado alcohólico

El alcohol obtenido por la participación de las levaduras durante la fermentación de los azúcares de las frutas se conoce como etanol, la evaluación de este parámetro es esencial para clasificar una bebida alcohólica, así como para determinar el gusto que tendrá al consumirse. El grado alcohólico hace referencia a la porción de etanol contenido en un volumen específico, normalmente en bebidas alcohólicas fermentadas a base de frutas, como el vino tiene una graduación del 7 % al 16% (Fuentes, 2019).

Su análisis se lo realiza mediante destilación del alcohol que permite obtener los líquidos orgánicos aplicando los distintos puntos de ebullición de los compuestos esto con el fin de obtener una mezcla etanol – agua, que facilita la medición con alcoholímetros graduados (**Mulet-Hing, 2013**).

1.1.6.6. Acidez volátil

Se trata de la presencia de ácidos orgánicos indeseables en la síntesis de las bebidas alcohólicas, se representan como ácido acético en un 90% del total de ácidos volátiles y se genera a partir de algunas frutas, pero también puede producirse por la acción de levaduras que oxidan el etanol procedente de la fermentación en presencia de oxígeno; la acidez volátil compromete el perfil de calidad de los vinos (**Tsegay, 2020**).

Vilela (2019) indica que la presencia de ácido acético en concentraciones mayores a 0.8 – 0.9 g/L causan la degradación del vino por el destacable olor a vinagre y sabor agrio; e indica que el límite máximo es de 1.2 g/L de ácido acético.

1.1.6.7. Metanol

La evaluación del metanol en las bebidas alcohólicas es necesaria para conocer la toxicidad que puede contener la bebida, esto debido a que el metanol se trata de un alcohol estructuralmente parecido al etanol, pero con propiedades negativas que pueden llevar al consumidor a padecer ceguera e incluso la muerte, incluso con la ingesta de pequeñas cantidades de 1g/kg de metanol (**López et al, 2020; Mayner-Tresol & Reyna-Villasmil, 2018**).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Evaluar las características fisicoquímicas y cinética de producción de biomasa de dos tipos de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus* en la fermentación alcohólica de una bebida a base de mandarina (*Citrus reticulata*) y cidra (*Sechium edule*)

1.2.2. Objetivos Específicos

- Elaborar la bebida alcohólica fermentada a base de mandarina (*Citrus reticulata*) y cidra (*Sechium edule*) utilizando las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus*
- Evaluar el efecto de los dos tipos de levadura en las características fisicoquímicas de la bebida alcohólica
- Determinar la cinética de producción de biomasa de los dos tipos de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus* durante el proceso de fermentación.

1.3. Hipótesis

1.3.1 Hipótesis nula

Los porcentajes de zumos de mandarina (*Citrus reticulata*) y cidra (*Sechium edule*) y el tipo de levadura en la bebida alcohólica no influirá en las características fisicoquímicas y en la cinética de producción de biomasa.

1.3.2. Hipótesis alterna

Los porcentajes de zumos de mandarina (*Citrus reticulata*) y cidra (*Sechium edule*) y el tipo de levadura en la bebida alcohólica influirá en las características fisicoquímicas y en la cinética de producción de biomasa.

1.4. Señalamiento de las variables

1.4.1. Variables independientes

- Tipo de levaduras
- Porcentajes de zumos de mandarina y cidra

1.4.2. Variables dependientes

- Parámetros fisicoquímicos
- Grado alcohólico
- Producción de biomasa

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Materiales

2.1.1. Materia Prima

Las dos principales materias primas (mandarinas y cidras) han sido obtenidas en el mercado mayorista de San Pedro de Pelileo, mientras que el resto de los materiales se han conseguido en tiendas populares de la ciudad de Ambato.

- Mandarinas
- Cidras
- Azúcar
- Levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus*)

2.1.2. Materiales de laboratorio y utensilios

- Vasos precipitación
- Tubos de Ensayo
- Gradilla
- Pipeta
- Micropipeta
- Cámara Neubauer
- Cubreobjetos
- Equipo de titulación
- Equipo de destilación
- Matraz Erlenmeyer
- Balón de aforo
- Botellas plásticas
- Airlocks

- Manguera
- Jeringas
- Fundas plásticas negras
- Cuchillo
- Colador
- Embudo
- Ollas

2.1.3. Equipos

- Extractor de zumos eléctrico
- Refractómetro portátil
- Potenciómetro (pH – metro)
- Microscopio óptico
- Termostato
- Destilador Vapodest

2.1.4. Reactivos

- Metabisulfito de Sodio
- Hidróxido de Sodio 0,1 N
- Fenolftaleína 1%
- Ácido sulfúrico
- Solución de almidón
- Solución de yodo 0,005 M
- Tetraborato sódico 55 g/L
- Ácido fosfórico 0,05 M
- Permanganato de potasio 0,05 M
- Bisulfito de sodio 0,05 M
- Ácido cromotrópico

2.2.Métodos

2.2.1. Proceso tecnológico de la elaboración de la bebida fermentada

Para la elaboración de la bebida alcohólica se siguió el siguiente esquema de la figura 3

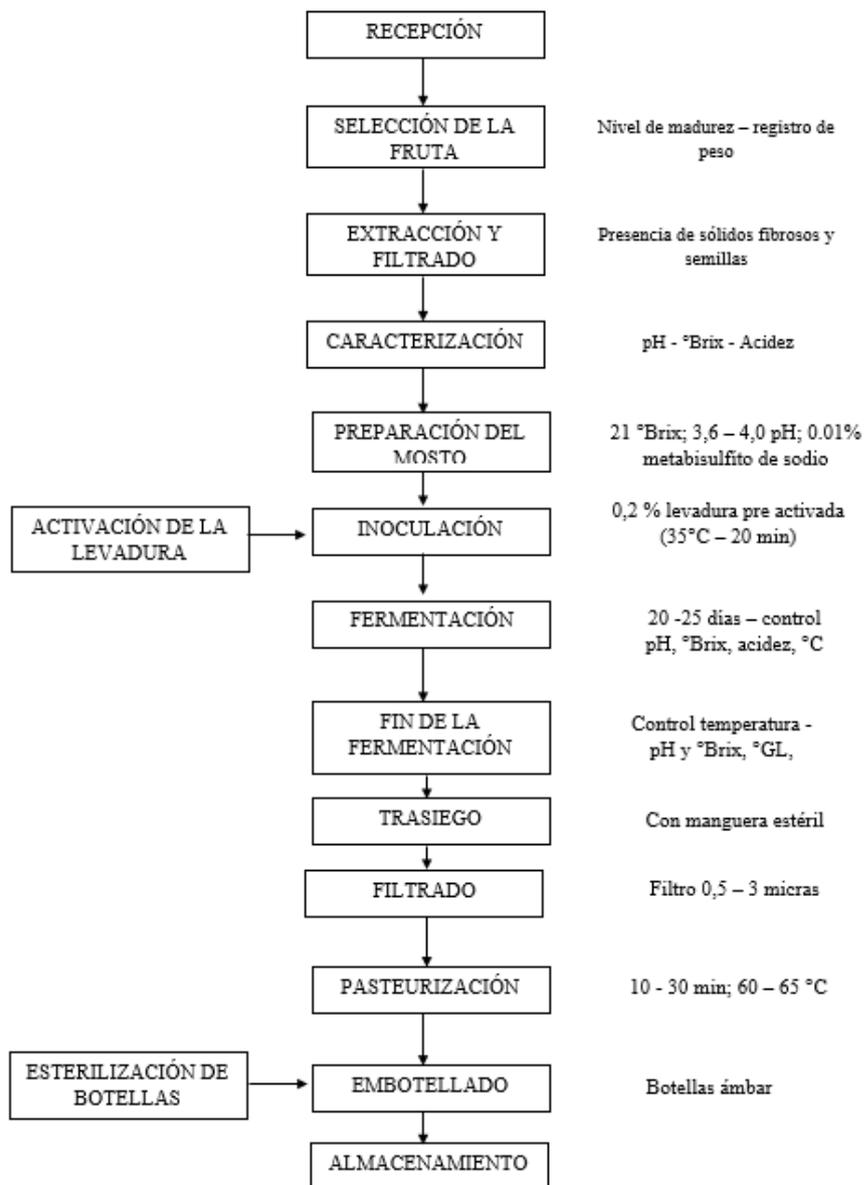


Figura 3: Diagrama de proceso para el desarrollo de la bebida alcohólica

Fuente: Elaboración propia

2.2.1.1. Selección y lavado de la materia prima

Se seleccionó las materias primas por índice de madurez y se desechó a aquellas que no cumplían con el requerimiento, como frutas dañadas, podridas o contaminadas con enfermedades propias de las mismas. Se procedió a lavar con abundante agua limpia, retirando trozos orgánicos ajenos a las materias primas (tallos, hojas), así como tierra y piedras que se hallaron, especialmente en las cidras.

2.2.1.2. Extracción de zumos

Se extrajo un total de 15 L para cada una de las matrices alimentarias. Para las mandarinas se utilizó extracción mecánica manual, con ayuda de un exprimidor de zumos y un tamiz para filtrar. Mientras que el zumo de cidra fue obtenido mediante el uso de un extractor de zumos marca OSTER, y luego fue tamizado dos veces para evitar la presencia en exceso de cualquier material fibroso.

2.2.1.3. Caracterización fisicoquímica de los zumos

- pH

La muestra se homogenizó con agitación antes del procedimiento. Se determinó por triplicado; para ello, se colocó 30 ml de muestra a un vaso de precipitación, se mezcló y se introdujeron los electrodos del potenciómetro, teniendo precaución de que estos no toquen ni el fondo, ni las paredes del vaso (NTE INEN-ISO 1842, 2013).

- Azúcares totales (°Brix)

Los azúcares totales (°Brix), se determinaron mediante el método AOAC (2007) 932.12, (37.1.15), con un refractómetro portátil, los zumos filtrados obtenidos previamente, se llevaron a 20 °C en un baño de agua, hecho esto, se procedió a tomar una gota con ayuda de un gotero o una pipeta y se colocó en el refractómetro; se analizaron las muestras de zumo de mandarina y zumo de cidra por triplicado, mismo procedimiento se detalla en (NTE INEN- ISO 2173, 2013).

- **Acidez Titulable**

Se utilizó el método potenciométrico dispuesto en **NTE INEN-ISO 750:2013** para lo cual se utilizaron 10 ml de zumo de cada una de las materias primas y se disolvió con 90 ml de agua destilada, a esto se le sumó una solución de hidróxido de sodio 0,1 N hasta alcanzar un pH de 8.1 – 8.3; la acidez titulable se expresará como % de ácido cítrico para mandarina y para cidra; y se obtuvo mediante la siguiente ecuación

$$\text{Acidez titulable} = \% \text{Acido cítrico} = \frac{V_{NaOH} * N_{NaOH} * M_{eq}}{V_{muestra}}$$

2.2.1.4. Preparación de Mosto

En cada fermentador se prepararon mostos para una formulación de 2L de acuerdo con el porcentaje de zumos 25, 50, 75 % y 75, 50, 25 % de mandarina y cidra respectivamente para cada uno de los tipos de levaduras, dando un total de 6 tratamientos con su respectiva réplica; estos fueron ajustados hasta una concentración de azúcares de 20 °Brix que fue leído a través de un refractómetro portátil marca ATAGO proporcionado por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, luego se esterilizaron con la adición de metabisulfito a razón de 0,01% con respecto al volumen de los mostos y se esperaron 4 horas antes de la inoculación.

2.2.1.5. Preparación de levaduras e inoculación

La activación de los dos tipos de levaduras se llevó a cabo bajo las mismas condiciones, se utilizó agua destilada para que las levaduras no sufran estrés por la adición directa del mosto en un volumen de 20 ml para cada uno de los tratamientos, se adicionó azúcar blanca comercial y se llevó a pH alrededor de 3,5 con ácido cítrico. Cuando el líquido alcanzó los 35 °C se adicionó 1 gramo de levadura para cada equipo fermentador y se mantuvo a temperatura constante durante 20 minutos.

Con los mostos en cada uno de los equipos de fermentación, se inocularon las levaduras y se homogenizó hasta asegurar la mezcla adecuada.

2.2.1.6. Fermentación

Los mostos quedaron en reposo durante 10 días en los laboratorios de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, no se pudo realizar bajo condiciones de temperatura específicas, por lo que fermentaron a la temperatura ambiente de la ciudad de Ambato de 10 – 22 °C (**AccuWeather, 2022**). Durante el reposo los tratamientos fueron sometidos a oscuridad.

2.2.1.7. Trasiego

Una vez finalizado el proceso de fermentación se realizó el trasiego, no sin antes añadir 100 ppm de metabisulfito de sodio a cada uno de los tratamientos, para evitar oxidaciones por la exposición al oxígeno, el trasiego se realizó con ayuda de una manguera adaptada a una jeringa de 60 ml para separar la bebida de los sedimentos que se encontraban al fondo del fermentador.

2.2.1.8. Filtrado

El líquido recuperado pasó por un proceso de filtración mediante dos tamices para terminar de separar cualquier resto de sedimentos.

2.2.1.9. Pasteurizado

Se realizó una pasteurización lenta en un intervalo de 60 – 65 °C por 20 minutos para cada tratamiento, para ello se utilizaron ollas de acero inoxidable previamente llevadas a calor para esterilizar.

2.2.1.10. Embotellado

Seguido del proceso anterior, se embotelló cada tratamiento en botellas color ámbar previamente esterilizada a temperatura de ebullición por 15 minutos y finalmente fueron tapadas.

2.2.2. Caracterización fisicoquímica de la bebida alcohólica

Se realizaron controles durante los 10 días de fermentación de:

- pH

Con un pH-metro marca BANTE modelo 210 de acuerdo con (NTE INEN-ISO 1842, 2013).

- Brix

Con el refractómetro portátil marca ATAGO siguiendo la metodología de AOAC (2007) 932.12, (37.1.15)

- Acidez total

La acidez total expresada en g/L de ácido tartárico se determinó de acuerdo con el método de ensayo OIV-MA-AS313-01, para ello se preparó la muestra eliminando el CO₂ presente agitando la muestra. La titulación se hizo con fenolftaleína como indicador. Luego se colocó 30 ml de agua destilada en el matraz junto con 1 ml de indicador y 10 ml de muestra preparada, se tituló con NaOH 0,1 mol/L hasta obtener el viraje de color a rosa pálido, el volumen gastado de la base será n en ml, dato que permitirá conocer la acidez total mediante la siguiente ecuación:

$$A = 10 n$$

Para obtener la acidez total en g ácido tartárico / L se calculó con la ecuación descrita a continuación:

$$A' = 0,075 x A$$

2.2.2.1. Grado alcohólico

Una vez finalizada la fermentación se determinó el grado alcohólico a través de **NTE INEN 340**, mediante la destilación de la bebida alcohólica. Para ello, se utilizaron 100 ml de la bebida fermentada, se colocó en el matraz de fondo redondo y se calentó a 78 – 80 °C para evaporar el alcohol, sin llegar al punto de ebullición del agua, el alcohol evaporado pasó por un condensador y se recogió el etanol en una probeta graduada, seguido a eso se llevó a volumen 100 ml con agua destilada. Obtenido el alcohol etílico, se procedió a utilizar el método del alcoholímetro de vidrio, con el cual se dió lectura de los grados de etanol contenidos en cada muestra previamente llevada a 15 °C de acuerdo con la temperatura de calibración del alcoholímetro.

El mejor tratamiento con mayor grado alcohólico fue evaluado con otros parámetros de acuerdo con INEN 374.

2.2.2.2. Acidez volátil

Por falta de tiempo para la destilación convencional se utilizó la técnica de destilación con arrastre de vapor mediante el equipo Destilador Vapodest marca GERHARDT modelo TT625 Al cual se le adicionó 20 ml de la muestra junto con 2 ml de una solución de ácido tartárico al 25% y se recuperó alrededor de 200 ml de destilado, a éste se procedió a titular con NaOH 0.1M (n), seguido se añadieron gotas de H₂SO₄ 25% para acidificar y una solución de almidón y se tituló con una solución de yodo 0,005M (n'); finalmente se añadió Bórax y se tituló con solución de yodo 0,005M (n'') Los volúmenes gastados de las titulaciones sirvieron para calcular la acidez volátil en forma de ácido acético mediante la siguiente ecuación.

$$AV = 0,300(n - 0,1 n' - 0,05n'')$$

2.2.2.3. Metanol

El metanol se determinó cualitativamente para conocer la presencia o ausencia en la bebida alcohólica, para ello se consideró la metodología propuesta por **López et al. (2020)**; donde se colocó 1 ml de la muestra y se añadió 1 gota de ácido fosfórico 0,05

M y 1 gota de permanganato de potasio 0,05M, se homogenizó y se dejó en reposo por un minuto; seguido se colocó gota a gota una disolución de bisulfito de sodio 0,05M hasta que el violeta generado por el permanganato de potasio desaparezca (viraje de color a café, por lo que se agregó gotas de ácido fosfórico 0,05M hasta obtener un color transparente; finalmente se colocaron 5 ml de ácido cromotrópico y se llevó a calentamiento por 10 minutos a 60 °C.

2.2.3. Cinética de producción de biomasa

2.2.3.1. Población celular

- Conteo celular

Se realizó el conteo celular a diario durante la fermentación mediante el uso de un microscopio óptico y la cámara de Neubauer, con los cuales se determinó el crecimiento celular de cada uno de los tratamientos, con estos datos se procedió a calcular la concentración de células, el tiempo de generación, y los coeficientes de rendimiento de biomasa y producto de acuerdo con las ecuaciones descritas a continuación.

$$N = N_0 2^n$$

Donde:

N: Número final de células

No: Número inicial de células

n: Número de generaciones que han ocurrido en la fase exponencial

t: Tiempo transcurrido entre cada generación

$$\text{Tiempo de generación} = t/n$$

$$Y_{M/S} = \frac{\text{masa de células nuevas}}{\text{masa de sustrato consumido para formar células nuevas}}$$

$$Y_{P/S} = \frac{\text{masa de producto formado}}{\text{masa de sustrato consumido para formar producto}}$$

Donde:

$Y_{M/S}$ = Coeficiente de rendimiento para la producción de biomasa por gramo de sustrato consumido.

$Y_{P/S}$ = Coeficiente de rendimiento para la producción de etanol por gramo de sustrato consumido

La cinética de crecimiento se establecerá de acuerdo con la fase exponencial de la curva de crecimiento de las levaduras.

2.2.4. Tratamiento Estadístico

2.2.4.1. Diseño Experimental

Los tratamientos se prepararon mediante el diseño factorial A*B (**Tabla 6**) para el posterior análisis estadístico con réplicas de cada uno. Se detallan los factores y niveles de un total de 12 tratamientos.

FACTOR A: Porcentaje de zumos

a₀ 25 % Mandarina; 75% Cidra

a₁ 50 % Mandarina; 50% Cidra

a₂ 75% Mandarina; 25% Cidra

FACTOR B: Tipo de Levadura

b₀ *Saccharomyces cerevisiae* comercial para panificación (Levapan) [Liofilizada]

b₁ *Saccharomyces bayanus* para vinificación (Fermivin 4F9) [Liofilizada]

Tabla 6: Diseño A x B, para conocer la influencia de los factores en el pH, Brix, acidez total, grado alcohólico y cinética durante la fermentación

		FACTOR A		
		a0	a1	a2
FACTOR B	b0	R ₁	R ₁	R ₁
		R ₂	R ₂	R ₂
	b1	R ₁	R ₁	R ₁
		R ₂	R ₂	R ₂

Tratamientos

A₀b₀R₁: Tratamiento con 25% de zumo de mandarina y 75% de zumo de cidra con *Saccharomyces cerevisiae* comercial para panificación.

A₀b₀R₂: Tratamiento con 25% de zumo de mandarina y 75% de zumo de cidra con *Saccharomyces cerevisiae* comercial para panificación.

A₁b₀R₁: Tratamiento con 50% de zumo de mandarina y 50% de zumo de cidra con *Saccharomyces cerevisiae* comercial para panificación.

A₁b₀R₂: Tratamiento con 50% de zumo de mandarina y 50% de zumo de cidra con *Saccharomyces cerevisiae* comercial para panificación.

A₂b₀R₁: Tratamiento con 75% de zumo de mandarina y 25% de zumo de cidra con *Saccharomyces cerevisiae* comercial para panificación.

A₂b₀R₂: Tratamiento con 75% de zumo de mandarina y 25% de zumo de cidra con *Saccharomyces cerevisiae* comercial para panificación.

A₀b₁R₁: Tratamiento con 25% de zumo de mandarina y 75% de zumo de cidra con *Saccharomyces bayanus* comercial para vinificación cepa 4F9.

A₀b₁R₂: Tratamiento con 25% de zumo de mandarina y 75% de zumo de cidra con *Saccharomyces bayanus* comercial para vinificación cepa 4F9.

A₁b₁R₁: Tratamiento con 50% de zumo de mandarina y 50% de zumo de cidra con *Saccharomyces bayanus* comercial para vinificación cepa 4F9.

A₁b₁R₂: Tratamiento con 50% de zumo de mandarina y 50% de zumo de cidra con *Saccharomyces bayanus* comercial para vinificación cepa 4F9.

A₂b₁R₁: Tratamiento con 75% de zumo de mandarina y 25 % de zumo de cidra con *Saccharomyces bayanus* comercial para vinificación cepa 4F9.

A₂b₁R₂: Tratamiento con 75% de zumo de mandarina y 25 % de zumo de cidra con *Saccharomyces bayanus* comercial para vinificación cepa 4F9.

2.2.4.2. Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico los datos se trataron con la ayuda de ANOVAS de dos vías (**Tabla 7**) que permitieron conocer la interacción entre los factores A y B detallados en la sección anterior en el desarrollo de las variables dependientes (grado alcohólico, acidez, °Brix, cinética microbiana, etc.) y la prueba post hoc de Tukey ($p \leq 0.05$) que indicó con mayor detalle dichas interacciones. Dicho tratamiento de datos se lo hizo mediante el paquete estadístico IBM SPSS Statistics.

El modelo matemático para este arreglo factorial se definirá por la siguiente ecuación

$$y_{ijk} = \mu + a_i + \beta_j + a*\beta_{ij} + \epsilon_{ijkl} \quad \mathbf{Ec.}$$

Tabla 7: ANOVA para el diseño factorial A x B con replicación

F.V.	S. C.	G. L.	C. M.	F_{exp}
Factor A	SCA	a-1	CMA	CMA/CMR
Factor B	SCB	b-1	CMB	CMB/CMR
Interacción	SC(AB)	(a-1)(b-1)	CM(AB)	CM(AB)/CMR
Residual	SCR	ab(r-1)	CMR	
TOTAL	SCT	abr-1	CMT	

Fuente: **Lara Porras (2000)**

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Elaboración de la bebida alcohólica

En la tabla 8 se encuentra la formulación para 2 litros de mosto de cada uno de los tratamientos propuestos. Las concentraciones de zumos de cidra y mandarina fueron de 75:25, 50:50 y 25:75 de cada fruta respectivamente para cada tratamiento. La adición de metabisulfito de sodio permitió la esterilización de los mostos al actuar sobre levaduras y bacterias propias de las frutas evitando posibles contaminaciones y además oxidaciones durante la fermentación (**Ruiz, 2011**). Por otra parte, los azúcares fueron ajustados hasta 20 °Brix de acuerdo con la tabla C1 para cada tratamiento (Anexo C1), de esta manera se conoció la cantidad en Kg de azúcar necesario para obtener un rendimiento de etanol que supere el 6% de acuerdo con la normativa vigente ecuatoriana.

Kadge et al. (2021) mencionó en su investigación de “vino de mandarina Nagpur” la adición de azúcares de caña y miel hasta alcanzar los 24 °Brix y esterilizó los mostos con 150 ppm de benzoato de sodio. Mientras que **XU & LIN (2009)** indican que para la preparación de mostos de chayote se lleva a 24 °Brix y antes de inocular se pasteuriza y se enfrían los jugos. Estos autores demuestran que es necesario realizar ajustes y esterilizaciones a los mostos con el fin de brindar las condiciones óptimas para la fermentación alcohólica sin la presencia de microorganismos nativos propios de la mandarina y cidra, así como, un grado considerable de sólidos solubles fermentables para generar la mayor cantidad de etanol producido por el proceso de glucólisis que transforma la glucosa y fructosa en alcohol (**Narváez-Guerrero, 2020**).

Tabla 8: Formulación para 2L de cada tratamiento de la bebida alcohólica

Materiales		T1		T2		T3		T4		T5		T6	
		R1	R2										
Mandarina	%	25	25	50	50	75	75	25	25	50	50	75	75
	L	0,5	0,5	1	1	1,5	1,5	0,5	0,5	1	1	1,5	1,5
Cidra	%	75	75	50	50	25	25	75	75	50	50	25	25
	L	1,5	1,5	1	1	0,5	0,5	1,5	1,5	1	1	0,5	0,5
<i>S. cerevisiae</i>	%	.025	.025	.025	.025	.025	.025	-	-	-	-	-	-
	g	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-
<i>S. bayanus</i>	%	-	-	-	-	-	-	.025	.025	.025	.025	.025	.025
	g	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1
Metabisulfito de sodio	%	.01	.01	.01	.01	.01	.01	.01	.01	.01	.01	.01	.01
	g	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Azúcar (20 °Brix)	%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Kg	0.358	0.353	0.310	0.310	0.260	0.252	0.356	0.352	0.311	0.308	0.246	0.273

Elaborado por: (Vallejo, 2023)

Se prepararon los mostos para cada tratamiento y se sellaron herméticamente los fermentadores para impedir el paso de oxígeno, además se colocaron trampas de aire (arilock) (**figura D2**) para evitar sobresaturación de gases generados por la fermentación en forma de CO₂. **Martínez (2014)** afirma que se coloca dicho dispositivo para impedir el ingreso de aire que oxida al mosto y lo convierte en vinagre y solo permite la expulsión de dióxido de carbono del medio.

Para la activación de los dos tipos de levadura se diluyó 0.5 g/L de cada cepa en 20 ml de agua destilada para evitar el estrés osmótico que se genera cuando se utiliza mismos los mostos para la activación ya que la osmolaridad del medio es superior a la de las levaduras por las altas concentraciones de glucosa, limitando las capacidades fisiológicas y la viabilidad en un 50 a 80% de los microorganismos, (**Gomar, 2015; Vital & Larralde, 2016**). El tiempo de activación fue de 20 minutos y la temperatura de 35 – 38 °C, condiciones cercanas a las descritas por **Tipán (2017)** que menciona que se debe activar obligatoriamente las levaduras cuando se encuentran liofilizadas a una temperatura de 32 °C, mientras que **Guerra (2014)** revela que la hidratación se dá a 30 °C en los 10 primeros minutos.

La fermentación alcohólica se llevó a cabo a temperatura ambiente de la ciudad de Ambato (10 – 22 °C) (AccuWeather, 2022) y se dejó en reposo durante 10 días, hasta que se observó que cada fermentador dejó de producir CO₂. El proceso se dio en condiciones de oscuridad con ayuda de fundas plásticas negras que cubrieron los tratamientos con el fin de evitar que se generen procesos de oxidación (Barrera, 2020). En una ponencia descrita por Valade (2017) muestra que, al exponer a la luz el mosto, la riboflavina producida por las levaduras presenta inestabilidad provocando propiedades oxidativas mayores, además con la foto degradación oxidativa, la metionina presente se degrada a metional que evolucionará y pasará a metanotiol y después a acroleína que generan olores a col, cebolla y ajo, y la presencia de acroleína incrementará el amargor de la bebida, estas características sensoriales generadas por los compuestos producidos por la foto degradación se los conoce como “gusto a luz” en vinos.

3.1.1. Caracterización fisicoquímica de las materias primas

Los zumos de las materias primas para la elaboración de la bebida alcohólica fueron caracterizados como se detalla en la tabla 9.

Tabla 9: Parámetros fisicoquímicos y rendimiento de la mandarina y cidra

Parámetro	Valor	
	Mandarina	Cidra
Rendimiento (Zumo/Fruta)	22.13%	31,89 %
pH	3.45 ± 0.011	6,23 ± 0.020
°Brix	10.6 ± 0.057	4,05 ± 0.212
Acidez (% Ac. cítrico)	1.07 ± 0.013	0,061 ± 0.003

Elaborado por: (Vallejo, 2023)

El rendimiento del zumo de mandarina fue de 22.13%, este bajo valor se debe a que la proporción de zumo por unidad de fruta es muy baja a diferencia de otros cítricos como la naranja (40 – 50%). Las mandarinas utilizadas fueron de maduración media “pintona” ya que en este punto es donde se encuentra la mayor cantidad de jugo. Aguagüiña (2014) muestra un 78.8 y 79.1 % de pulpa en mandarinas pintonas de la zona de Patate

y Baños respectivamente. Dicho experimento obtuvo mayor rendimiento al conseguido en el presente estudio, debido a que se filtraron los zumos con el objetivo de eliminar el material fibroso propio de la mandarina, puesto que la ausencia de sólidos suspendidos en los mostos permite aumentar rendimientos de producto de acuerdo a un estudio realizado por **Salazar (2010)**.

El zumo de mandarina alcanzó un pH promedio de 3.45, mientras que la acidez titulable alcanzada fue de 1,88 % ácido cítrico, los sólidos solubles obtuvieron una media de 10.6 °Brix, estos valores se relacionan con los obtenidos por **Aguagüña (2014)** que indica que mandarinas para el grado de madurez “pintona” en zonas de Patate y Baños tienen un pH de 3.74 y 3.53, la acidez en % de ácido cítrico es de 1.60 y 2.00% , y los sólidos solubles son de 12 y 10 °Brix respectivamente para cada parámetro.

Para la cidra o chayote, el rendimiento obtenido fue de 31.89%, al utilizar un extractor para la obtención de los zumos se obtuvo mayor rendimiento en relación con la mandarina. En la cidra, gran parte de su peso está distribuido en su semilla y la cáscara; así mismo, al filtrar el zumo por dos ocasiones, se eliminaron los restos fibrosos, lo que permitió la obtención de zumo sin ningún tipo de residuo. **Moreira (2018)** indica que el porcentaje de semilla y cáscara es de 24.11 y 4.88 % respectivamente para el grado de madurez “pinton”, mismo que se utilizó en este experimento.

Por otra parte, en las propiedades fisicoquímicas del chayote o cidra se obtuvo un pH de 6.24, similar al obtenido por **Paredes (2022)** el cual fue de 5.26, para azúcares solubles se consiguió 4.05 °Brix, cercano al alcanzado por **Cadena et al. (2021)** de 5,34 °Brix, valor similar al obtenido por **Moreira (2018)** que fue de 3.87 de la cidra cultivada en la ciudad de Baños. Con respecto a la acidez en % de ácido cítrico se consiguió un valor de 0.061% cercano al 0.075% reportado por **Caro (2019)** y visiblemente mayor al 0.050% demostrado por **García et al., (2022)**. Todas las variaciones presentadas se pueden dar debido a las condiciones del suelo, el clima, grado de madurez y la época en la que fueron cosechadas las cidras.

3.1.2. Variables medidas durante la etapa fermentativa

Durante la etapa de fermentación de los mostos para la obtención de la bebida alcohólica se midieron los siguientes parámetros:

3.1.2.1.Sólidos Solubles (Brix)

Los sólidos solubles antes de empezar la fermentación se ajustaron a 20 ± 0.3 °Brix de esta manera se aseguró la igualdad en todos los tratamientos con respecto a esta medida, en el anexo A2 se observa el decrecimiento de los grados Brix durante los días de fermentación de cada tratamiento. El agotamiento de los azúcares mientras el tiempo transcurre da paso a la formación de producto (etanol), así como a la generación de biomasa nueva.

El ajuste inicial de azúcares sirvió como fuente de carbono para las levaduras que los transformaron en etanol y de esta manera obtener un grado alcohólico suficiente para considerar a la bebida dentro de la normativa ecuatoriana para bebidas alcohólicas. Se observa en el gráfico 1 que los tratamientos tienen un comportamiento de decrecimiento similar entre ellos en cuanto al consumo de azúcares desde el día 0, a excepción del tratamiento A₀B₁R₁ el cual posiblemente presentó un desajuste en el acondicionamiento de los mostos, haciendo énfasis en la reducida carga de levaduras que presentó al inicio. A pesar de ello, la reducción de sólidos solubles continuó de manera más lenta con respecto de los demás tratamientos. En el día 10 de la etapa de finalización de la fermentación el tratamiento A₀B₁R₁, redujo los azúcares hasta 7 °Brix, dicho valor es mayor al obtenido en los demás tratamientos que se encontraron en el rango de 5.5 a 6.3 °Brix, lo cual significaría que se obtuvo un menor rendimiento alcohólico en comparación con los otros tratamientos debido a la poca presencia de biomasa generada durante el proceso de fermentación.

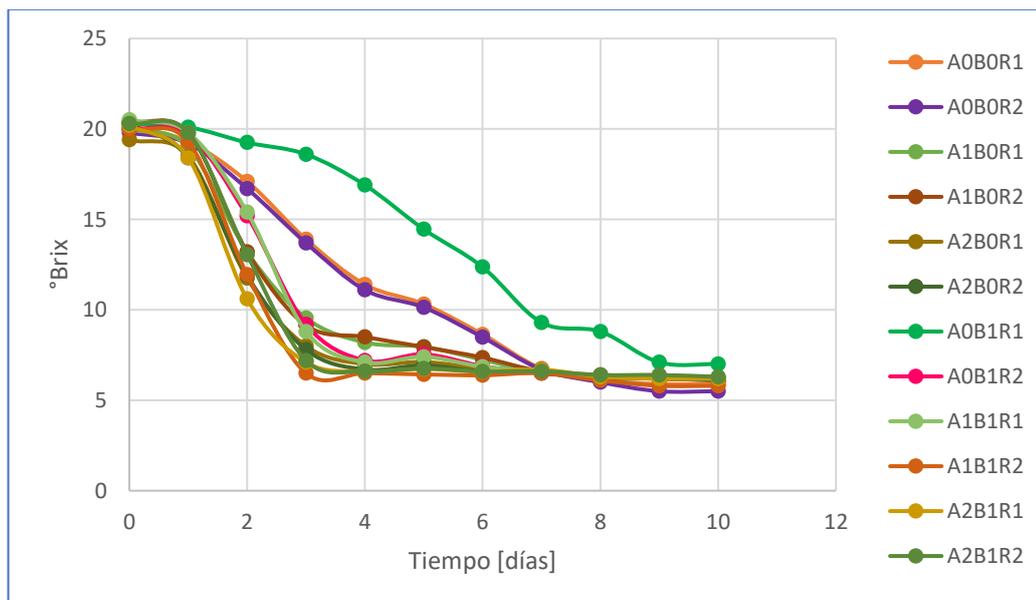


Gráfico 1: Comportamiento de azúcares (Brix) respecto al tiempo para todos los tratamientos

Elaborado por: (Vallejo, 2023)

El análisis de varianza de los tratamientos se encuentra detallado en el anexo B1 e indica que a un nivel de confianza del 95% no se encontraron diferencias significativas para los factores A, B y la interacción A x B al final de la fermentación, indicando que la variable respuesta °Brix no se ve afectada por ninguno de los factores, ni por la interacción de estos ya que sus medias son cercanamente iguales.

3.1.2.2. Potencial Hidrógeno (pH)

El promedio de pH para los tratamientos se encontró en 4.18 ± 0.31 al iniciar la fermentación, debido a los distintos porcentajes de cada zumo. De esta manera, los tratamientos con valores mayores a 4.18 son aquellos con el mayor porcentaje de zumo de cidra y los valores menores a 4.18 aquellos con mayor porcentaje de zumo de mandarina, dado por la acidez propia de los dos tipos de materia prima.

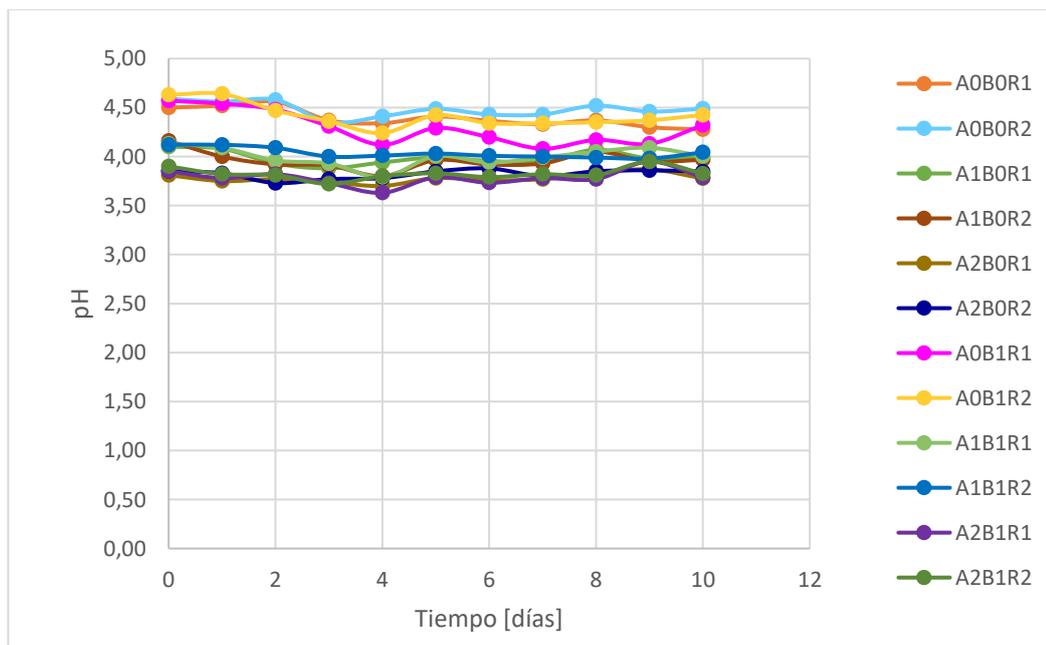


Gráfico 2: Comportamiento del pH respecto al tiempo para todos los tratamientos

Elaborado por: (Vallejo, 2023)

En el gráfico 2 se observa el comportamiento del pH de los 6 tratamientos y sus réplicas en el transcurso de los 10 días que duró la fermentación, donde se evidencia la existencia de leves variaciones con descensos y ascensos de pH. **Ribéreau-Gayon et al. (2006)** explica que este fenómeno se da ya que se considera a los vinos o mostos como soluciones tampón ácido-básicas que por su composición química genera limitadas variaciones en el pH.

El descenso de pH se hace más notorio en los tratamientos A₀B₁R₁, A₀B₁R₂, A₀B₀R₁ y A₀B₀R₂, pues se trata de aquellos con una proporción 75:25 zumos de cidra y mandarina, al tener mayor pH que los demás tratamientos, la producción de ácidos orgánicos se vuelve más evidente, las muestras mencionadas a excepción de A₀B₁R₂ descienden sus pH hasta el día 4, a partir del cual empieza un período de variaciones mínimas en el pH. Los ocho tratamientos restantes, tienden a un comportamiento similar entre ellos desde el día 0, es decir con variaciones pequeñas en el pH durante los 10 días.

En el anexo A4 se observa que, en la etapa de finalización de la fermentación, el pH de cada tratamiento tuvo una pequeña disminución con respecto al pH inicial de entre

0.02 a 0.23, siendo menor la variación en los tratamientos con mezcla de zumos 25:75 cidra – mandarina y esta variación aumenta progresivamente en los tratamientos con mezclas de zumos 75:25 cidra – mandarina.

El análisis de varianza para este parámetro se observa en el anexo B2 que indica que el factor A (Porcentaje de zumos) existen diferencias significativas por lo que al realizar la prueba de comparaciones múltiples se presentaron tres subconjuntos demostrando que las medias de los tres niveles del factor A; 75:25 cidra – mandarina, 50:50 cidra – mandarina y 25:75 cidra – mandarina son diferentes entre sí, mientras que para el factor B (Tipo de Levadura) y la interacción A x B no existen diferencias significativas.

3.1.2.3.Acidez Total

La acidez total al igual que el pH inició con una variación en los valores del día 0, debido a los porcentajes de zumos que presentó cada tratamiento; es decir, los tratamientos A₀B₀R₁, A₀B₀R₂, A₀B₁R₁ y A₀B₁R₂ empezaron con un promedio de 2.63 ± 0.29 al tener una proporción 75:25 cidra y mandarina, A₁B₀R₁, A₁B₀R₂, A₁B₁R₁ y A₁B₁R₂ con un promedio de 4.88 ± 0.45 en una proporción 50:50 cidra-mandarina y A₂B₀R₁, A₂B₀R₂, A₂B₁R₁ y A₂B₁R₂ iniciaron con promedio de 6.98 ± 0.09 con 25:50 cidra y mandarina.

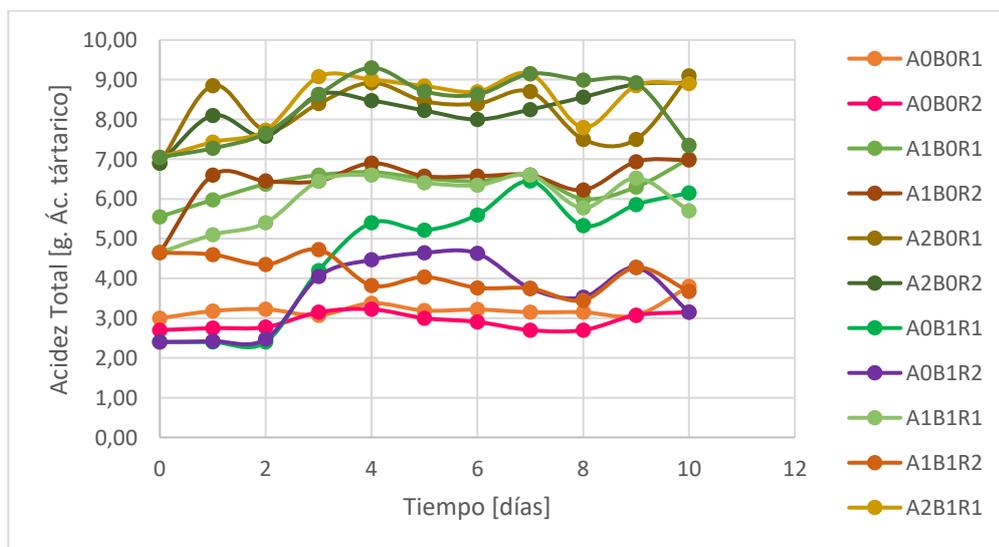


Gráfico 3: Comportamiento de la acidez total respecto al tiempo para todos los tratamientos

Elaborado por: (Vallejo, 2023)

Al observar el gráfico 3, los tratamientos $A_0B_0R_1$, $A_0B_0R_2$, $A_0B_1R_1$ y $A_0B_1R_2$ tienen un punto de partida cercano, el tratamiento $A_0B_1R_1$ aumenta su acidez a partir del tercer día, esto puede deberse a que dicho fermentador pudo haberse contaminado, o tuvo contacto con el oxígeno por un tiempo prolongado al tomar las alícuotas, por lo que este aumento puede generarse por la síntesis de ácido acético.

Los tratamientos $A_1B_0R_1$, $A_1B_0R_2$, $A_1B_1R_1$ y $A_1B_1R_2$ presentan puntos de partida similar, a pesar de ello, $A_1B_1R_2$ tiene una tendencia de decrecimiento mayor en comparación con los otros tres, indicando un descenso en la acidez. El último grupo de tratamientos $A_2B_0R_1$, $A_2B_0R_2$, $A_2B_1R_1$ Y $A_2B_1R_2$ presentan un comportamiento similar, en donde se ve ascensos y descensos de acidez mismos explicados por **Vilela (2019)** que indica que estas variaciones se dan principalmente porque durante el proceso fermentativo alcohólico se producen ácidos orgánicos como el pirúvico que se da en función del metabolismo celular por la transformación de azúcares a etanol, el ácido acético que se genera al presentar oxidación enzimática, el ácido succínico que está involucrado en el metabolismo lipídico de las levaduras, y entre otros ácidos que se encuentran en menor o igual medida.

En el anexo A3 se observa el incremento de acidez total en el último día de fermentación en relación al día 0, todos los tratamientos a excepción de $A_0B_0R_1$ y $A_0B_1R_2$ cumplen con la norma **NTE INEN 374 (2016)** que estipula un mínimo de 3.5 gramos de ácido tartárico por litro. La mayor acidez final en un rango de 7.00 a 9.00 la tienen los tratamientos formulados con 25:75 cidra – mandarina, datos cercanos a los reportados por **Fuentes (2019)** que obtuvo valores entre 4.89 a 9.30 g.AT/L en vinos blancos.

El análisis de varianza de los tratamientos se observa en el anexo B4, con el 95% de confianza existe significancia en el factor A, por lo que se hallaron dos subconjuntos donde el primer nivel; 75:25 cidra – mandarina y el tercer nivel 25:75 cidra – mandarina tienen medias distintas, indicando que son significativamente diferentes.

Por otro lado, no existen diferencias significativas para el factor B y la interacción A x B

3.1.2.4. Conteo de cel/ ml durante la fermentación

Las curvas que demuestran el comportamiento de los dos tipos de levaduras en el tiempo en función de los 12 tratamientos se observan en el gráfico 4, mientras que en el anexo A5 se detalla las cel/ml que se han generado diariamente hasta el final del proceso de fermentación, a partir de estos datos se obtuvieron los coeficientes de rendimiento de biomasa y producto, tiempo de generación, así como la velocidad máxima de crecimiento de los dos tipos de levaduras en el respectivo mosto de acuerdo a los tratamientos formulados.

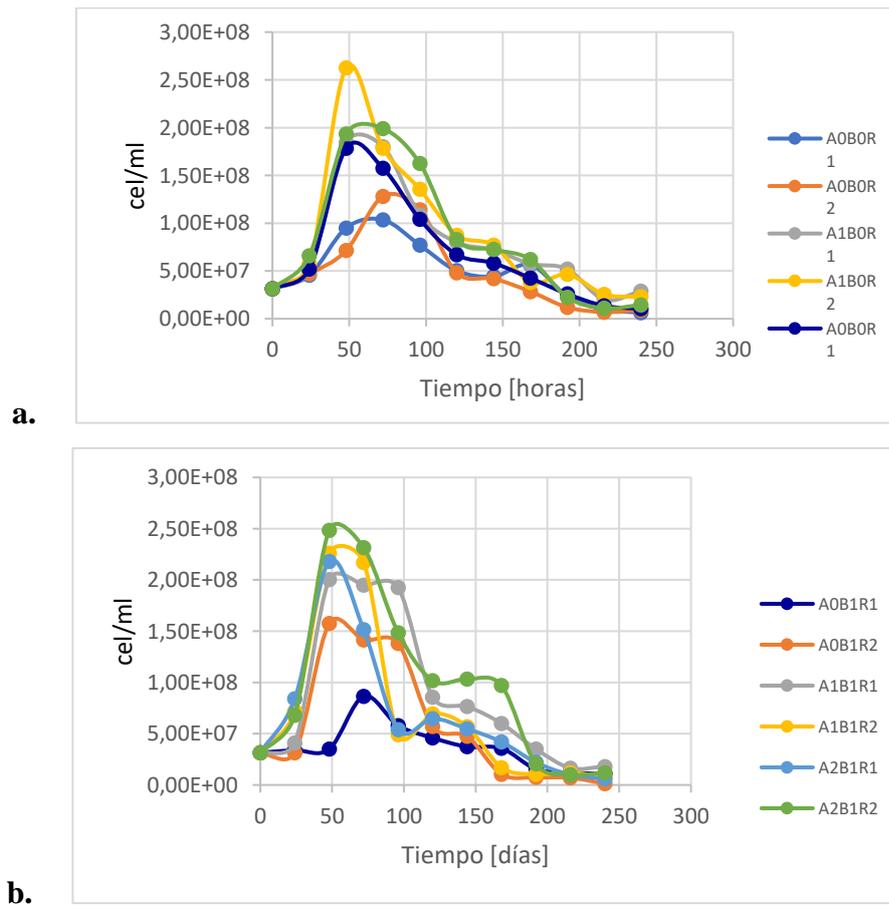


Gráfico 4: Comportamiento de cel/ml respecto al tiempo **a.** *S. cerevisiae*, **b.** *S. bayanus*

Elaborado por: (Vallejo, 2023)

Se observa en el gráfico 4a las curvas para *Saccharomyces cerevisiae*, donde el tratamiento A₁B₀R₂ (2.63x10⁸ cel/ml) es aquel con el pico más alto en el crecimiento de células a las 48h de fermentación, mientras que A₀B₀R₁ (1.04x10⁸ cel/ml) tiene el menor crecimiento exponencial. Se muestra el mismo patrón en el gráfico 4b para *Saccharomyces bayanus* donde se observa que el tratamiento A₂B₁R₂ (2.49x10⁸ cel/ml) alcanza la mayor producción celular a las 48h y A₀B₁R₁ (8.65x10⁷ cel/ml) la menor, teniendo su máximo pico a las 72h. Este comportamiento, donde la reproducción celular es baja, puede explicarse debido a la acidez del mosto de dichos tratamientos, como se mencionó en el apartado de pH, cuatro de los tratamientos iniciaron con una menor acidez (pH > 4.18) por la formulación 75:25 cidra – mandarina, la cual no representa las condiciones óptimas para una reproducción máxima de células, siendo mejor aquellos tratamientos que presentaron cercanía a un pH de 3,5.

El análisis de varianza de este apartado se observa en el anexo B6, indica que existe significancia para el factor A al 95% de confianza, por lo que se ha hallado dos subconjuntos donde el nivel uno correspondiente a 75:25 cidra – mandarina y el nivel dos 50:50 cidra – mandarina tienen medias significativamente diferentes, mientras que factor B y la interacción A x B no tienen significancia y sus medias son cercanas.

3.1.3. Cinética de producción de biomasa

3.1.3.1. Concentración celular

Cada tratamiento inició con una concentración celular 3x10⁷ cel/ml con una densidad de 1.0308 g/ml, a partir del día cero, se realizó un conteo diario empleando la técnica del hemocitómetro, lo que permitió llegando al pico máximo entre las 48 y 72 horas tanto para *Saccharomyces cerevisiae* como para *Saccharomyces bayanus* en cada una de las muestras, teniendo en común que aquellos con la menor concentración celular, son los tratamientos A₀B₀R₁ (1,04x10⁸ cel/ml), A₀B₀R₂ (1,14x10⁸ cel/ml), A₀B₁R₁ (7,23x10⁷ cel/ml) y A₀B₁R₂ (1,40x10⁸ cel /ml) con el 75% de zumo de cidra y 25% zumo de mandarina. A partir de las 48 y 72 horas, empezó el declive de la población

celular, presumiblemente por la sedimentación de células al fondo de los fermentadores, puesto que no se empleó ningún proceso de agitado durante la fermentación y las alícuotas se tomaron del centro del mosto. Además, al final del proceso fermentativo ocurre el descenso de la viabilidad y por ende de la concentración celular dado por varias causas como la síntesis de ácidos orgánicos que cambian el pH del medio, la sensibilidad de las levaduras ante la presencia de etanol en niveles de 4 – 5.5 ° alcohólicos que resulta tóxico, generado a partir del consumo de los nutrientes y azúcares por parte de las mismas levaduras que terminará en la muerte de los microorganismos (Hoyos *et al.*, 2010; Oteruelo, 2018).

El comportamiento de las levaduras de este estudio es similar al mostrado por (Kumar *et al.* (2020) que usa la piel de mandarina para la fermentación e indica que la biomasa aumenta al inicio del proceso y disminuye a partir del cuarto día de fermentación, en este caso, el crecimiento progresivo de la biomasa se da hasta el segundo y tercer día, al cuarto día empieza el descenso. Además, Kumar et al. añade que esta tendencia de decrecimiento continua hasta que la tasa de crecimiento se vuelve negativa desde el noveno día el décimo día.

3.1.3.2. Cinética de producción de biomasa

Las cinéticas de producción de biomasa de *S. cerevisiae* y *S. bayanus* se obtuvieron a partir de la fase exponencial de las curvas Ln (cel/ml) vs Tiempo, como se observa en el anexo A8 las ecuaciones que describen el comportamiento de las dos cepas en cada tipo de mosto, lo cual permite conocer la cantidad de biomasa que se generó diariamente. Así mismo, en los anexos D1 – D6 para *S. cerevisiae* y los anexos D7 – D12 para *S. bayanus*, muestran el decrecimiento de la cantidad de sustrato (glucosa), mientras se incrementa la cantidad de biomasa en función del tiempo.

En el anexo A11 se encuentran los coeficientes de rendimiento de biomasa y etanol producido, se observa que el tratamiento A₁B₀R₂ correspondiente a 50:50 zumo de cidra y mandarina con *S. cerevisiae* tiene el mayor rendimiento de biomasa en la fase exponencial con 1x10⁷ cel/g sustrato, el rendimiento de producto (etanol) fue de 48.51%, esto indica que este tratamiento destinó el consumo de azúcares a la replicación de células en lugar de producir etanol al tener el rendimiento más bajo de

producto. Por otro lado, el tratamiento con mayor rendimiento de alcohol fue el A₀B₀R₂ que corresponde a 75:25 zumo de cidra – mandarina y *S. cerevisiae* con 67.84 % y con una producción de biomasa de 1.04x10⁷ cel/g sustrato en la fase exponencial, notablemente menor al anterior. **Gómez - Ruiz et al. (2007)** al aislar cepas de *S. cerevisiae* nativas de la región productora de mezcal obtuvo el mayor Y_{p/s} de 6.8 %, dato muy por debajo del obtenido en este estudio.

Además, en el anexo A12 se observa los tiempos de generación (g) y se visualiza que el tratamiento A₂B₁R₁ es el que tiene menor tiempo de generación de 15.02 h seguido de A₁B₁R₂ con 23.12 h, resultados cercanos a los presentados por **Sener et al. (2007)** con levaduras del género *Saccharomyces*, que revela que los tiempos de generación se reducen con el aumento de temperatura, teniendo 26.2 h a 18 °C y 16.9 h a 25 °C, en este estudio se trabajó a 10 - 22 °C correspondiente a la temperatura media de la ciudad de Ambato en el mes de noviembre (**AccuWeather, 2022**) en el que se puso en marcha el proyecto, lo cual explicaría la cercanía en los resultados obtenidos por aquel autor. Por su parte, **Pérez (2011)** indica que un medio pobre en nutrientes alcanza tiempos de duplicación mayores y menciona que mientras más diluido se encuentre un medio, menor será la biomasa producida. Por otro lado, **Delignette-Muller (1998)** muestra que este parámetro está relacionado con la velocidad de crecimiento exponencial, la cual a su vez esta influenciada por las condiciones físicas y químicas del medio. Esto explicaría los resultados obtenidos en esta tesis ya que el tiempo de generación (g) de levaduras del género *Saccharomyces* está entre 1.73 y 2.42 h durante la fase logarítmica (**Deacon, 1986**) en medios con condiciones óptimas de fermentación.

La velocidad máxima obtenida para cada tratamiento se encuentra detallada en el anexo A8, el tratamiento A₂B₁R₁ con *S. bayanus* tiene una velocidad máxima en la fase exponencial de 0.041 h⁻¹, este tratamiento posiblemente tuvo contacto prolongado con el oxígeno por lo que se especularía que la levadura dio paso a la replicación celular, pues al presentarse O₂ en el medio, las levaduras crecen eficazmente (**Curia et al., 2010**). Le sigue el tratamiento A₁B₁R₂ con 0.0317 h⁻¹, este tratamiento no tuvo ningún problema en el proceso de fermentación. Finalmente, el tratamiento con valor de μ_{máx} menor es el A₀B₀R₁ con 0.0153 h⁻¹ perteneciente a *S. cerevisiae*, indicando que la levadura vínica tiene una mayor eficiencia en la reproducción celular.

3.1.4. Análisis Fisicoquímico al final de la fermentación

3.1.4.1. Alcohol

En el anexo A6 se observan los porcentajes promedios de alcohol etílico obtenidos para cada uno de los 12 tratamientos, se evidenció diferencias entre los tratamientos en la evaluación final del producto como se indica en el gráfico 5 donde se observa que los tratamientos A₀B₀R₂ y A₀B₀R₁ son aquellos con el mayor porcentaje, 10 % y 9 % v/v respectivamente; mientras que A₀B₀R₁, A₀B₀R₂ y A₀B₁R₁ son aquellos con la menor proporción de etanol, todos con el 6 % v/v. A pesar de las diferencias, todos los tratamientos se encuentran dentro de la normativa **NTE INEN 374 (2016)** que dicta un límite mínimo del 6 %.

Salas-Millán et al. (2022) obtuvieron en su investigación valores cercanos a 10 % v/v, en bebida tipo “vino” de melón Jimbee y Okashi; así mismo **Ramdas (2015)** indica que en la fermentación de mostos a base de naranja consiguió un contenido de alcohol máximo del 8.30 % al final del proceso con distintas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* muy cercanos a los alcanzados en este trabajo con la misma levadura.

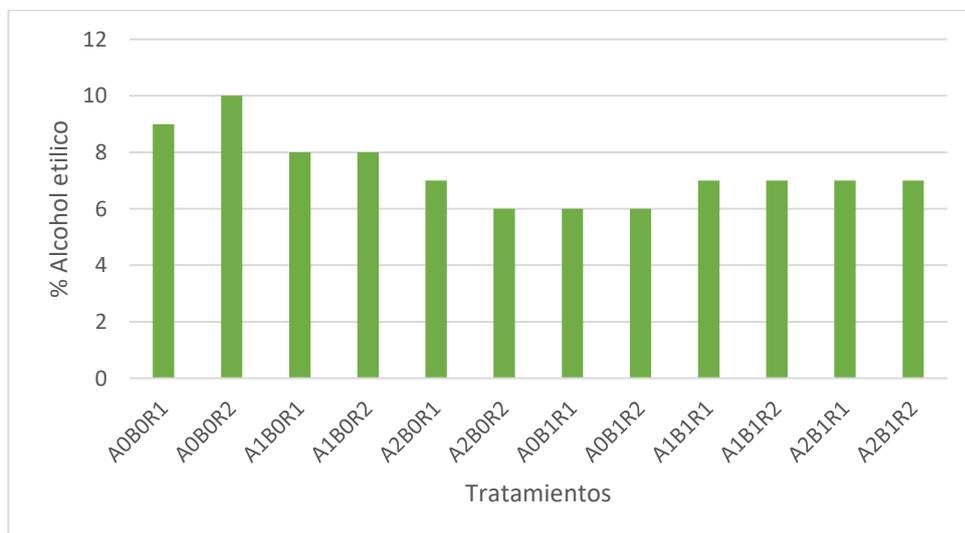


Gráfico 5: Porcentaje de alcohol etílico producido para cada tratamiento

Elaborado por: (Vallejo, 2023)

El análisis de varianza de los tratamientos para la variable respuesta % alcohol etílico se ve en el anexo B8 e indica que existen diferencias significativas para los factores A y B, así como para la interacción A x B. La prueba de comparaciones múltiples (Anexo B9) demuestra que el factor A presenta dos subconjuntos, donde el nivel 75:25 cidra-mandarina y el nivel 25:75 cidra-mandarina presenta medias diferentes.

3.1.4.2. Acidez Volátil

La acidez volátil fue determinada en gramos de ácido acético por litro, al tratarse del principal ácido en bebidas fermentadas alcohólicas que aporta efectos como acidez y olor, importantes en la calidad final (Santos, 2015).

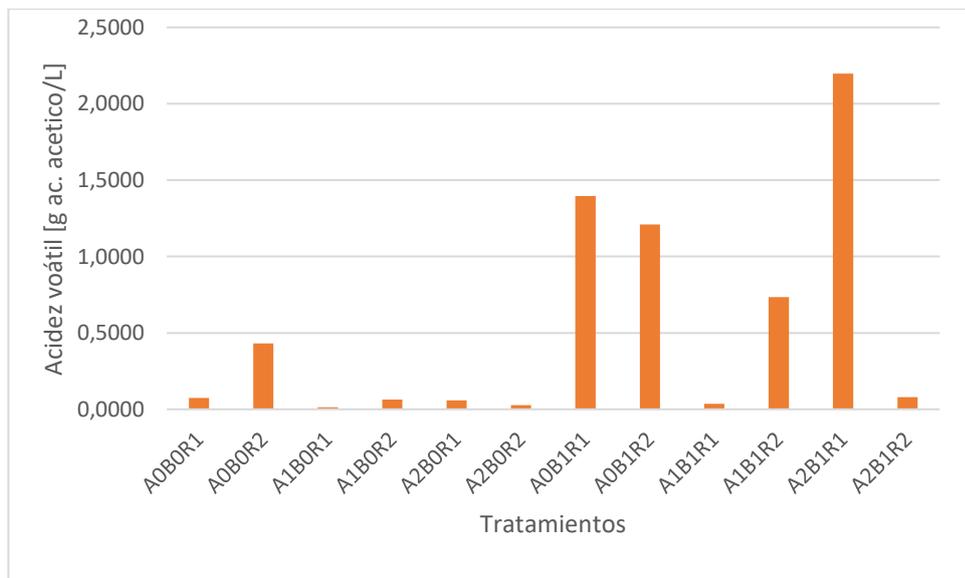


Gráfico 6: Acidez volátil de los tratamientos

Elaborado por: (Vallejo, 2023)

En el gráfico 6 se exhibe la cantidad de ácido acético presente en los tratamientos una vez fueron embotellados, se observa que la mayor parte no alcanza los 0.5 g/L. similar a lo obtenido por Cruz de Aquino et al. (2012) en vinos tintos con valores de 0.32 y 0.37 g/L indicando un resultado satisfactorio al obtener bajas cantidades de ácidos volátiles, lo que significa que el mayor porcentaje de acidez se encuentra en términos de ácido tartárico. Sin embargo, en dos tratamientos, A₀B₁R₁ y A₀B₁R₂ la acidez volátil

se encuentran cerca del límite máximo estipulado por la **NTE INEN 374 (2016)** de 1,5 g/L estos resultados pueden darse por varios factores, el primero puede ser por la inadecuada manipulación del producto, y el segundo factor puede deberse a una desviación de la ruta metabólica de las levaduras por presencia de oxígeno.

Por otra parte, el tratamiento $A_2B_1R_1$ al presentar inconvenientes en el fermentador al octavo día, generó una mayor cantidad de ácido acético, dejando de producir etanol, por lo cual se evidencia en el anexo A7 que hay 2.52 gramos de ácido acético por litro, valor muy por encima del permitido por la normativa. **Cruz de Aquino et al. (2012)** indican que productos que sobrepasan el límite se consideran “picados” con sabor amargo y olor característico a vinagre y por lo tanto de baja calidad sensorial y química.

El análisis de varianza para la acidez total con un nivel de confianza del 95% se refleja en el anexo B10 e indica que no existen diferencias significativas para el factor A y B, así como para la interacción A x B, que demostraría que ninguno de los factores tiene incidencia en la presencia de ácidos volátiles en el producto final.

3.1.4.3. Presencia de metanol

Los mejores tratamientos en cuanto a mayor porcentaje de etanol generado fueron evaluados cualitativamente para conocer la presencia o ausencia de metanol en la bebida final; de esta manera se describe en la tabla 10 los resultados obtenidos.

Tabla 10: Resultados de la determinación cualitativa para presencia/ausencia de metanol en los mejores tratamientos

Tratamiento	Detalle
$A_0B_0R_1$	Negativo
$A_0B_0R_2$	Positivo
$A_1B_0R_1$	Positivo
$A_1B_0R_2$	Negativo

Elaborado por: (Vallejo, 2023)

Marquina et al. (2018) indica que la presencia de metanol en las bebidas alcohólicas supone una amenaza para la salud del consumidor y más aún cuando se encuentra en proporciones mayores a las establecidas en normativa. De acuerdo con **NTE INEN**

374 (2016) la tolerancia máxima es de 1000.0 mg/L; mientras, **Challo (2021)** menciona que en el estudio de metanol en vinos tintos el máximo contenido hallado fue de 377.09 mg/L.

Además, **Saadat & Rafizadeh (2019)** en la determinación de metanol en destilados herbáceos informan que obtuvieron resultados positivos en todas las muestras. Sin embargo, el color violeta que indica positividad presentaba diferentes intensidades, de tal manera que, de acuerdo con soluciones estándar, 50 mg/L indica una baja intensidad del color y >200 mg/L una mayor. En el presente trabajo, se evidenció respuestas positivas con una intensidad de color mínima en los tratamientos A₀B₀R₂ y A₁B₀R₁ como se observa en las figuras D17 y D18 respectivamente denotando la presencia en mínima cantidad de este alcohol y por tanto se considera que se encuentra dentro de la normativa ecuatoriana. Los otros dos tratamientos tuvieron respuestas negativas al no presentar ninguna tonalidad de color violeta.

3.1.5. Verificación de la hipótesis

Con los resultados obtenidos, para los parámetros fisicoquímicos medidos durante la fermentación; pH, acidez total, sólidos solubles (°Brix) y después de la fermentación como el grado alcohólico y acidez volátil, además de la cinética de crecimiento, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna, afirmando que existen cambios significativos en al menos uno de los tratamientos propuestos, siendo el factor A (concentración de zumos) el mayor influyente en los resultados finales.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES

- La elaboración de la bebida fermentada alcohólica a base de mandarina (*Citrus reticulata*) y cidra (*Sechium edule*) obtuvo un producto satisfactorio, pues al final de la fermentación, todos los tratamientos produjeron etanol 6 y 10 % de etanol. La caracterización de los zumos permitió observar la polaridad que tenían las principales materias primas, la mandarina con acidez de $1,07 \pm 0.013$, pH de 3.45 ± 0.011 y °Brix de $10,6 \pm 0.057$ al contrario de la cidra con acidez de $0,061 \pm 0.003$, pH de $6,23 \pm 0.020$ y °Brix de $4,05 \pm 0.212$. La mezcla de ambos zumos permitió tener un mejor acondicionamiento en cuanto a acidez de los mostos, siendo más efectivos los tratamientos con 25:75 cidra-mandarina con valores entre 6.9 y 7.05 % de ácido tartárico. Además, el ajuste de azúcares permitió que los tratamientos alcancen porcentajes alcohólicos estipulado por la NTE INEN 374 del 6%.
- *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus* en los parámetros medidos durante la fermentación, no presentaron cambios relevantes en cuanto a su cinética. El pH y los °Brix en todos los tratamientos mantuvieron semejanzas durante los 10 días de fermentación; por su parte. Por otro lado, los parámetros medidos después de la fermentación indican que los tratamientos A₀B₀R₁ y su réplica A₀B₀R₂ correspondientes a 75:25 cidra-mandarina con *S. cerevisiae* generaron la mayor cantidad de alcohol con el 9 y 10 % respectivamente. Además, la acidez volátil para gran parte de los tratamientos a excepción de A₂B₁R₁, se encontró dentro de lo establecido por la norma INEN 374 y en cuanto a presencia de metanol, al evaluar cualitativamente, se determinó que hay presencia en mínimas cantidades en los tratamientos A₀B₀R₂ y A₁B₀R₁ gracias a las bajas intensidades de la tonalidad del violeta que representa positividad, mientras que el resto de los tratamientos resultaron negativos.
- Las cinéticas de biomasa de los dos tipos de levadura en los distintos mostos se vieron comprometidas por las condiciones físicas y químicas del medio; *S. cerevisiae* aun al tener el mayor coeficiente de rendimiento alcohólico con

69.93 % al 75:25 cidra-mandarina no presentó la mayor producción de biomasa, al contrario de *S. cerevisiae* en medio 50:50 cidra-mandarina tuvo un mayor rendimiento en la biomasa por unidad de sustrato con 0.095% pero con bajo rendimiento alcohólico. Además, el mejor tiempo de generación lo obtuvo *S. bayanus* con respecto a *S. cerevisiae*. La levadura vínica presentó la velocidad máxima en la fase exponencial. También, en las curvas hubo decrecimientos a partir de las 74 y 96 horas de las levaduras debido a los cambios en el acondicionamiento del medio durante la fermentación y la baja resistencia de *S. cerevisiae* al etanol mismo producido.

- De los tratamientos propuestos, A₀B₀R₁ (75:25 cidra-mandarina con *S. cerevisiae*) obtuvo el mejor resultado en cuanto a rendimiento alcohólico por lo que al ser analizado en los demás parámetros de acuerdo con la NTE INEN 374 para bebidas alcohólicas: “vinos de frutas” cumple con los requisitos de la normativa al tener, 10% etanol, acidez total de 3.8 % ácido tartárico, acidez volátil de 0,0735 gramos de ácido acético por Litro y <50 mg/L de metanol.

CAPITULO V

MATERIAL DE REFERENCIA

- AccuWeather. (2022). Tiempo mensual en Ambato, Tungurahua, Ecuador . Recuperado el 4 de febrero de 2023, de <https://www.accuweather.com/es/ec/ambato/126320/november-weather/126320?year=2022>
- Aguagüiña Pilla, S. C. (2014). *Efecto del grado de maduración y zona de cultivo en las características físicas y químicas de la mandarina (Citrus reticulata)*. Universidad Técnica de Ambato.
- AOAC. (2007). Association of Official Analytical Chemist. "*Official Methods of Analysis*"., 18 TH Edition, Virginia, D. C. USA
- Arias, A., Barrios, A., Simonsen, E., & Tejada, S. (2019). Identificación morfológica, fisiológica y molecular de levaduras del género *Saccharomyces* para la elaboración de cerveza. *Mente Joven*, 8, 55–64. Recuperado de https://revistas.unilibre.edu.co/index.php/mente_joven/article/view/7554
- Baque, M. F., & Bermeo, J. M. (2018). *Aplicación de técnicas clásicas y vanguardistas en la elaboración de postres a partir de productos andinos: chayote *Sechium Edule*, chirimoya *Annona Cherimola* Mill, frijol *Phaseolus Vulgaris*, jícama *Pachyrhizus Erosus* y taxo *Passiflora Tripartita* Var. *Moll** (Universidad de Cuenca). Recuperado de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/39770>
- Barrera, J. (2020). *Desarrollo de un vino partiendo del fruto *Vaccinium myrtillus* (Arándano azul), en la empresa casa vinícola los Frayles S.A.* (Fundación Universidad de América). Recuperado de <https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/8190/1/6142430-2020-2-IQ.pdf>
- Blanco, A. J. (2016). *Modelamiento cinético de la fermentación alcohólica de miel de abejas a diferentes escalas de producción* (Universidad Nacional de Colombia Facultad). Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/56557/>

- Cadena, J., Arévalo, M. de L., Avendaño, C. H., & Ruiz, L. del M. (2021). Diseño y transferencia de la Variedad vegetal de chayote [*Sechium edule* (Jacq) Sw .] var . *virens levis* “ CAÑITAS ”. *Agro-Divulgación*, *1*(1), 45–50. <https://doi.org/https://doi.org/10.54767/ad.v1i2.33>
- Carbonero, P. (1975). *Bioquímica de las fermentaciones*. Universidad Politécnica de Madrid, Madrid.
- Caro, O. C. (2019). *Evaluación de parámetros de calidad e ingenieriles en la cocción de chayote (Sechium edule Sw.)*. Universidad Autónoma de Sinaloa.
- Castañeda, M. (2019). *Estequiometría y cinética del crecimiento microbiano*. La Plata.
- Challo, R. (2021). *Determinación de metanol y etanol por cromatografía de gases en vinos tintos elaborados en el distrito de Calana, Tacna - 2020* (Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann). Recuperado de <http://repositorio.unjbg.edu.pe/handle/UNJBG/4184>
- Ciani, M., Comitini, F., & Mannazzu, I. (2008). Fermentation. *Ecological Processes*, *6*, 1548–1557.
- Cirulli, B. A. (2018). *Saccharomyces cerevisiae como herramienta para estudiar proteínas del metabolismo de hemo de Trypanosoma cruzi* (Universidad Nacional de Rosario). Recuperado de <http://hdl.handle.net/2133/15795>
- Constante, G. K. (2015). *Determinación de la osmotolerancia de nueve cepas de levaduras aisladas de frutos de mora para la aplicación industrial en procesos de fermentación alcohólica* (Universidad Técnica de Ambato). Recuperado de <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/12944>
- Coronel, D. A. (2015). *Aislamiento e indentificación de Taxa de levaduras presentes en el fruto de mortiño (Vaccinium floribundum) con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica* (Universidad Politécnica Salesiana). Recuperado de <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/9052>
- Correa, N. I., & Jara, B. M. (2017). *Elaboración de nuevas propuestas culinarias a base de chayote (Sechium edule)* (Universidad de Guayaquil). Recuperado de <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/20737>

- Cruz de Aquino, M. A., Martínez, R. A., Becerril, E., & Chávaro, M. del S. (2012). Caracterización física y química de vinos tintos producidos en Querétaro. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35(ESPECIAL 5), 61–67. https://doi.org/10.35196/rfm.2012.especial_5.61
- Curia, M. V, D'Alessandro, O., & Briand, L. E. (2010). *La Enseñanza de Conceptos en Biotecnología a través de un Experimento Sencillo y Económico*. 3(1), 27–30. <https://doi.org/10.4067/S0718-50062010000100005>
- Deacon, J. W. (1986). Introduction to Modern Mycology. En Wilkinson JF (Ed.), *Mycoses* (Vol. 7). <https://doi.org/10.1111/J.1439-0507.1986.TB03250.X>
- Delignette-Muller, M. L. (1998). Relation between the generation time and the lag time of bacterial growth kinetics. *International Journal of Food Microbiology*, 43(1–2), 97–104. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00100-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00100-7)
- Fleet, G. H. (2008). Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 979–995. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x>
- Fredes, S. N., Ruiz, L. Á., & Recio, J. A. (2021). Modeling °Brix and pH in wine grapes from Satellite images in Colchagua valley, Chile. *Agriculture (Switzerland)*, 11, 697. <https://doi.org/10.3390/agriculture11080697>
- Fuentes, C. I. (2019). *Determinación del grado alcohólico, acidez volátil y total, anhídrido sulfuroso y hierro en algunos vinos semi secos blancos y tintos comercializados en la ciudad de Arequipa-2018* (Universidad Privada Autónoma del Sur). Recuperado de <http://repositorio.upads.edu.pe/xmlui/handle/UPADS/63>
- Fundación Española de Nutrición. (2013). *Mandarina*. 273–274. Recuperado de <http://www.fen.org.es/mercadoFen/pdfs/mandarina.pdf>
- Garcés, D. G. (2013). *Estudio para la creación de una empresa productora y comercializadora de vino de cereza en la provincia de Chimborazo* (Escuela Politécnica del Ejército). Recuperado de <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/3735/1/T-ESPEL-0396.pdf>
- García, L., Duque, A., Mejía, D., Padilla, L., & Giraldo Y. (2022). *Caracterización físico - química de la cidra *Sechium Edule* (Jacq.) Sw. Impregnada a vacío con*

maracuyá (Universidad del Quindío). Recuperado de <https://proceedings.science/slaca/slaca-2015/trabalhos/caracterizacion-fisico-quimica-de-la-cidra-sechium-edule-jacq-sw-impregnada-a-va#>

Gomar, Mercé. (2015). *Respuesta de las Levaduras al Estrés Osmótico causado por Elevadas Concentraciones de Glucosa: Función de las proteínas Hgi1 y Hot1* (Universitat de València). Recuperado de <http://hdl.handle.net/10550/47233>

Gómez Ruiz, S. E., de los Ríos Deras, G. C., Soto Cruz, N. O., López Miranda, J., & Rutiaga Quinones, O. M. (2007). Capacidad fermentativa de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* nativas de la región productora de mezcal de Durango. *III Congreso Nacional de Biotecnología y Bio-ingeniería VII, Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras. Durango. [En línea], 14(1997), 2002.* Recuperado de http://www.smbb.com.mx/congresos/smbbacpulco09/TRABAJOS/AREA_X/CX-18.pdf.

Gordillo Vinuesa, G. G., Narvárez García, A., Aguilar Carrera, J. O., & Sánchez, F. F. (2022). Bebidas Alcoholicas Base Frutales Ecuador. *Pol. Con.*, 7(6), 267–280. <https://doi.org/10.23857/pc.v7i6.4073>

Guerra, A. (2014). *Fermentos y tiempos de fermentación en la elaboración de vino de borojó (Borojoa patinoi)*. *Quevedo - Los Ríos*. Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

Hoyos, J., Urbano, F. E., Villada, H. S., Mosquera, S. A., & Navia, D. P. (2010). Determinación de parámetros fermentativos para la formulación y obtención de vino de naranja (*Citrus sinensis*). *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 8(1), 26–34.

INEC. (2000). *Censo Nacional Agropecuario*. Recuperado de <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/censo-nacional-agropecuario/>

Integrated Taxonomic Information System. (2023, enero 11). Report: *Citrus reticulata*. Recuperado el 11 de enero de 2023, de www.itis.gov

Kadge, N., Patil, S., & Sonkamble, A. (2021). Influence of sugar sources and blended must on physico-chemical and sensory characteristics of Nagpur mandarin wine. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 10(1), 2706–2710.

<https://doi.org/10.22271/phyto.2021.v10.i1al.13767>

- Kumar, G. V. P., Sanjib Kumar, P., Khobragade, C. B., Bania, B., & Sengupta, D. (2020). Requirements of mixed tangerine (*Citrus tangerine*) and pineapple (*Ananas comosus*) powdered peel wastes fermentation for citric acid production. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal*, 22(2), 194–207.
- Lara Porras, A. M. (2000). “*Diseño Estadístico de Experimentos, Análisis de la Varianza y Temas Relacionados: Tratamiento Informático mediante SPSS.*” Proyecto Sur de Ediciones.
- López, R. N., Alcántara, E. L., & Gavilán, C. I. (2020). Validación de la determinación cualitativa y cuantitativa de metanol en bebidas alcohólicas: un enfoque docente. *Revista tediq*, 6(6), 12–18.
- Márquez, A. (2015). *Producción de etanol por Saccharomyces cerevisiae en floculación inducida por adhesión de nanotubos de carbono funcionalizados.* Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Marquina, H., Maldonado, A., Monascal, Y., Cartaya, L., Álvarez, Á., Truillo, P., & Mora, J. (2018). Concentración de metanol en algunas bebidas alcohólicas comercializadas en Venezuela por medio de la técnica GC-FID. *Avances en Química*, 13(2), 41–44. Recuperado de <https://www.redalyc.org/journal/933/93357709002/html/>
- Martínez Mora, E. O. (2014). *Proyecto de Factibilidad para la obtención de vino a partir de la Grosella China (Averrhoa carambola) cantón Machala.* Universidad Agraria del Ecuador.
- Mayner-Tresol, G., & Reyna-Villasmil, E. (2018). Intoxicación aguda por metanol. Reporte de caso. Acute methanol poisoning. Case report. *Avances en Biomedicina*, 7(3).
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2017). *Boletín Situacional. Mandarina.* Recuperado de <http://sipa.agricultura.gob.ec>
- Miño, J. E., Herrera, J. L., & González, E. (2011). Microvinificación con levaduras nativas y uvas Isabella cultivadas en Misiones. *Centro Azúcar*, 38(4), 21–27.

- Miranda, D., Judith, F., Orduz, J. O., Álvaro, C., Pérez, C. P., Parada, F., ... Arias, E. (2020). *Mandarina (Citrus reticulata Blanco): Manual de recomendaciones técnicas para su cultivo en el departamento de Cundinamarca* (C. T. Agroindustrial, Ed.). Bogotá, D.C.
- Montes de Oca, R., Salem, A. Z. M., Kholif, A. E., Monroy, H., Pérez, L. S., Zamora, J. L., & Gutiérrez, A. (2016). *Yeast Additive and Animal production* (A. Z. Salem & A. K. Kholif, Eds.). Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/293605511_YEAST_DESCRIPTION_AND_STRUCTURE
- Moreira, R. S. (2018). *Caracterización morfológica y composición físico-química de la fruta Cidrayota (Sechium edule) de la variedad virens levis cultivada en los cantones Piñas (El Oro) y Baños (Tungurahua). Trabajo* (Universidad Técnica de Ambato). Recuperado de <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/27307>
- Mulet-Hing, M. (2013). Automatización de la destilación de alcohol de la UEB destilería de la ronera Santiago de Cuba. *Tecnología Química*, XXXIII(1), 5–11. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/4455/445543778001.pdf>
- Narvaez Guerrero, B. A. (2020). *Estudio comparativo del rendimiento de la producción de bioetanol mediante métodos de extracción de primera y segundo generación a partir de la caña de azúcar (Saccharum officinarum)* (Universidad Católica de Santiago de Guayaquil). Recuperado de <http://repositorio.ucsg.edu.ec/handle/3317/15511>
- NTE INEN 374. (2016). *Bebidas Alcohólicas. Vino de Frutas. Requisitos*. Quito: Servicio Ecuatoriano de Normalización.
- Norma NTE INEN - ISO 2173. *Productos vegetales y de frutas - Determinacion de solidos solubles - Metodo refractométrico (IDT)*. 2013-09
- Norma NTE INEN-ISO 1842. *Productos vegetales y de frutas. Determinacion de pH(IDT)*. (2013)
- Norma NTE INEN-ISO 750. *Productos vegetales y de frutas. Determinación de acidez titulable (IDT)*. (2013)

- Norma NTE INEN 340. *Bebidas alcoholicas. Determinación del contenido de alcohol etílico. Método del alcoholímetro de vidrio.* 2016-08
- Oteruelo, B. (2018). *Estudio de la tolerancia a elevadas concentraciones de azúcar de Saccharomyces cerevisiae vnicas* (Universidad de Valladolid). Recuperado de <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/31758>
- Paredes, K. E. (2022). *Elaboración y caracterización de una biopelícula biodegradable a partir del chayote (Sechium edule) para el uso en alimentos* (Escuela Superior Politécnica de Chimborazo). Recuperado de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/17690>
- Perez, J. (2011). *Evaluación del efecto de diferentes diluciones de agua de coco suplementada con biotina, para la producción de levadura (Saccharomyces cerevisiae) a nivel matraz y en biorreactor de tanque agitado* (Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas). Recuperado de <http://hdl.handle.net/10521/643>
- Polo, M. (2018). *Patent Núm. 2902202.* Recuperado de <https://patentimages.storage.googleapis.com/a4/87/36/7a663916f25db3/ES2902202T3.pdf>
- Puerta Quintero, G. I. (2010). Fundamentos del proceso de fermentación en el beneficio del café. *Fondo Nacional del Café*, 12. <https://doi.org/https://doi.org/10.38141/10779/0402>
- Ramdas, M. (2015). *Study fermentation characteristics of orange wine produced by using different yeast strains* (Garden City University). Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/345714746_STUDY_FERMENTATION_CHARACTERISTICS_OF_ORANGE_WINE_PRODUCED_BY_USING_DIFFERENT_YEAST_STRAINS
- Ramírez, M. E., & Arias, M. (2000). Uso alternativo de las frutas en preparación de mostos y fermentos. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*, 53(1), 835–847.
- Reyes, E. C. (2012). *Estudio del Chayote (Sechium edule (Jacq.)Sw)* (Universidad Veracruzana). Recuperado de <https://docplayer.es/14067741-Universidad-veracruzana-facultad-de-ciencias-biologicas-y-agropecuarias-zona-orizaba->

cordoba-estudio-del-chayote-sechium-edule-jacq-sw.html

- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of Enology* (Second; L. John Wiley & Sons, Ed.). Recuperado de <https://www.ptonline.com/articles/how-to-get-better-mfi-results>
- Ruiz Ortega, H. (2011). Desarrollo De Un Vino De Mortiño (Arándanos) En La Corporación Gruppo Salinas De Ecuador. *Universidad Pública de Navarra*, 97. Recuperado de <http://academica-e.unavarra.es/mwg-internal/de5fs23hu73ds/progress?id=AyDvLIVzgjURwro9x4B4wa2Ia3cXtxl-Yf5dOU6KfRY>,
- Saadat, F., & Rafizadeh, A. (2019). Rapid Determination of Methanol In Herbaceous Distillates For Their Safety Evaluation by A New Modified Chromotropic Acid Method. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*, 18(2), 703. <https://doi.org/10.22037/IJPR.2019.1100661>
- Salas-Millán, J. Á., Aznar, A., Conesa, E., Conesa-Bueno, A., & Aguayo, E. (2022). Fruit Wine Obtained from Melon by-Products: Physico-Chemical and Sensory Analysis, and Characterization of Key Aromas by GC-MS. *Foods*, 11(22), 2–14. <https://doi.org/10.3390/foods11223619>
- Salazar, G. (2010). “*Estudio de la influencia de tres variedades de levaduras vinicas (Saccharomyces bayanus (LALVIN EC1118), Saccharomyces bayanus (LALVIN QA23), Saccharomyces cerevisiae var. cerevisiae (LALVIN ICV OPALE)) y levadura de panificación (Saccharomyces cerevisiae (Universidad Técnica de Ambato).* Recuperado de <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/handle/123456789/5301/Mg.DCEv.Ed.1859.pdf?sequence=3>
- Santos, A. F. (2015). *Olfactory perception threshold assessment of volatile acidity in Madeira wines* (Universidade da Madeira). Recuperado de <https://digituma.uma.pt/bitstream/10400.13/880/1/MestradoAndreiaMiranda.pdf>
- Sener, A., Canbas, A., & ÜNAL, M. Ü. (2007). The effect of fermentation temperature on the growth kinetics of wine yeast species. *Turk, J. Aric For*, 349–354. Recuperado de

https://www.researchgate.net/publication/299106472_The_effect_of_fermentation_temperature_on_the_growth_kinetics_of_wine_yeast_species

Stacey, A. S. (2014). *Estudio y análisis de la variedad de mandarina tipo común de Ecuador y propuesta gastronómica de autor*. (Universidad Internacional del Ecuador). Recuperado de

<https://repositorio.uide.edu.ec/bitstream/37000/411/1/T-UIDE-0390.pdf>

Stainer, R. Y., Ingraham, J. L., Wheelis, M. L., & Painter, P. R. (2005). Microbiología. En J. R. Villanueva (Ed.), *Microbiología* (Segunda). Recuperado de <https://books.google.com/books/about/Microbiología.html?hl=es&id=2u-6Q2XCMDgC>

Tenorio Sanz, M. D., Aparicio Cediel, I. M., de Prádena, J. M., García, M., Pérez, M. L., Redondo, A., ... Zapata, M. A. (2014). El vino y su análisis. *Universidad Complutense de Madrid*, 1, 42–45. Recuperado de [http://eprints.ucm.es/29446/7/PIMCD Nº 243. ANEXO 1. E-BOOK- EL VINO Y SU ANÁLISIS.pdf](http://eprints.ucm.es/29446/7/PIMCD_Nº_243_ANEXO_1_E-BOOK-EL_VINO_Y_SU_ANALISIS.pdf)

Tipán, C. C. (2017). *Vino de Piña (Ananas comosus L.) con tres concentraciones de miel de abeja en el canton Quevedo - 2017* (Universidad Técnica Estatal de Quevedo). Recuperado de <http://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/3595>

Tsegay, Z. T. (2020). Total titratable acidity and organic acids of wines produced from cactus pear (*Opuntia-ficus-indica*) fruit and Lantana camara (*L. Camara*) fruit blended fermentation process employed response surface optimization. *Food Science and Nutrition*, 8(8), 1–14. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1745>

Ulloa, J. P. (2015). *Elaboración de bebidas alcohólicas a base de frutas amazónicas, como alternativa para la creación de una carta de cocteles exóticos*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

USDA, U. S. D. of A. (2019). *Chayote, fruit, raw*. Recuperado de <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/170402/nutrients>

Valade, M. (2017). Cómo identificar y prevenir el gusto de luz - Acenología. *Revista de enología científica y profesional*. Recuperado de https://www.acenologia.com/congreso_cava_17/

- Vilela, A. (2019). Use of nonconventional yeasts for modulating wine acidity. *Fermentation*, 5(1), 1–15. <https://doi.org/10.3390/fermentation5010027>
- Vital, P., & Larralde, C. P. (2016). Respuestas metabólicas al estrés de levaduras de importancia industrial. *Investigación y Ciencia: de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, ISSN-e 1665-4412, N°. 67, 2016, págs. 86-91, (67), 86–91. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6137745&info=resumen&idoma=SPA>
- Walker, G. M. (2009). Yeasts. *Desk encyclopedia of microbiology*, (2), 1174–1187. Recuperado de Academic Press/Elsevier.
- Winn, W. C., Allen, S. D., Janda, W. M., Koneman, E. W., Procop, G. W., Schreckenberger, P. C., & Woods, G. L. (2006). *Koneman. Diagnostico Microbiologico/ Microbiological diagnosis: Texto Y ... - Elmer W. Koneman, Stephen Allen - Google Libros* (Sexta). Bueno Aires : Editorial Medica Panamericana .
- XU, X., & LIN, C. (2009). Fermentation technology of Chayote wine. *Department of Food Science and Engineering*, 5, 167--170.
- Zumárraga, M., & Barbero, F. (2013). *Saccharomyces cerevisiae* Contribución organoléptica en la vinificación. *Revista Oficial de la Asociación de Bodegas de Rioja Alavesa*, 2–3.

ANEXOS

A. Datos Experimentales

Tabla A1: Tratamientos Experimentales

TRATAMIENTOS	RÉPLICAS	ZUMOS		LEVADURA
		CIDRA	MANDARINA	
A0B0	R1	75 %	25 %	<i>S. cerevisiae</i>
A0B0	R2	50 %	50 %	<i>S. cerevisiae</i>
A1B0	R1	25 %	75 %	<i>S. cerevisiae</i>
A1B0	R2	75 %	25 %	<i>S. cerevisiae</i>
A2B0	R1	50 %	50 %	<i>S. cerevisiae</i>
A2B0	R2	25 %	75 %	<i>S. cerevisiae</i>
A0B1	R1	75 %	25 %	<i>S. bayanus</i>
A0B1	R2	50 %	50 %	<i>S. bayanus</i>
A1B1	R1	25 %	75 %	<i>S. bayanus</i>
A1B1	R2	75 %	25 %	<i>S. bayanus</i>
A2B1	R1	50 %	50 %	<i>S. bayanus</i>
A2B1	R2	25 %	75 %	<i>S. bayanus</i>

Elaborado por: (Vallejo, 2023)

Tabla A2: Comportamiento de Sólidos solubles en grados Brix durante los días de fermentación para cada uno de los tratamientos

TRATAMIENTOS	DÍAS											
	Previa corrección	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A0B0R1	5,65	20,20	19,30	17,10	13,90	11,40	10,3	8,6	6,750	6,10	5,90	5,90
A0B0R2	5,85	19,80	19,20	16,70	13,70	11,10	10,1	8,5	6,70	6,00	5,50	5,50
A1B0R1	7,6	20,00	19,00	13,20	9,55	8,20	8,0	7,2	6,50	6,30	6,20	6,20
A1B0R2	7,6	20,40	19,80	13,20	9,15	8,50	7,9	7,4	6,60	6,40	6,20	6,20
A2B0R1	9,6	19,40	18,50	11,75	8,00	7,0	7,1	6,8	6,60	6,30	6,20	6,10
A2B0R2	9,4	20,30	18,40	11,90	7,80	6,70	6,9	6,6	6,50	6,20	6,20	6,10
A0B1R1	5,75	20,30	20,10	19,25	18,60	16,90	14,5	12,4	9,30	8,80	7,10	7,00
A0B1R2	5,9	20,00	19,70	15,20	9,20	7,20	7,5	6,9	6,50	6,30	6,20	6,20
A1B1R1	7,55	20,50	19,80	15,40	8,80	7,10	7,4	6,9	6,60	6,30	6,20	6,20
A1B1R2	7,7	20,00	19,30	11,95	6,50	6,50	6,4	6,4	6,50	6,10	5,80	5,80
A2B1R1	10,15	20,20	18,40	10,60	7,10	6,60	6,7	6,6	6,70	6,30	6,20	6,20
A2B1R2	9,1	20,30	19,80	13,05	7,20	6,60	6,8	6,6	6,60	6,40	6,40	6,30

Elaborado por: (Vallejo, 2023)

Tabla A3: Comportamiento de Acidez en % de ácido tartárico durante los días de fermentación para cada uno de los tratamientos

TRATAMIENTOS	DÍAS										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A0B0R1	3,00	5,48	3,23	3,08	3,38	3,19	3,22	3,15	3,15	3,08	3,80
A0B0R2	2,70	4,95	2,78	3,15	3,23	3,00	2,91	2,70	2,70	3,08	3,15
A1B0R1	5,55	8,18	6,38	6,60	6,68	6,52	6,45	6,60	6,00	7,05	6,00
A1B0R2	4,65	6,60	6,45	6,45	6,90	6,57	6,57	6,60	6,23	6,94	5,55
A2B0R1	6,90	8,85	7,73	8,40	8,93	8,46	8,40	8,70	7,50	9,41	7,50
A2B0R2	6,90	8,10	7,58	8,63	8,48	8,23	8,00	8,25	7,05	8,89	7,20
A0B1R1	2,40	4,65	2,40	4,20	5,40	5,21	5,60	6,45	5,33	3,64	6,15
A0B1R2	2,40	5,25	2,48	4,05	6,60	4,65	4,63	3,75	3,53	4,28	3,15
A1B1R1	4,65	5,10	5,40	6,45	6,60	6,41	6,35	6,60	5,78	6,53	5,70
A1B1R2	4,65	5,78	4,35	4,73	3,83	4,03	3,76	3,75	3,45	4,28	3,68
A2B1R1	7,05	8,10	7,73	9,08	9,00	8,84	8,70	9,15	7,80	8,85	8,38
A2B1R2	7,05	7,28	7,65	8,63	9,30	8,71	8,63	9,15	7,35	8,93	7,35

Elaborado por: (Vallejo, 2023)

Tabla A4: Comportamiento del pH durante los días de fermentación para cada uno de los tratamientos

TRATAMIENTOS	DÍAS										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A0B0R1	4,50	4,52	4,56	4,37	4,34	4,41	4,36	4,33	4,37	4,30	4,28
A0B0R2	4,59	4,56	4,58	4,35	4,41	4,49	4,43	4,43	4,52	4,46	4,49
A1B0R1	4,10	4,08	3,93	3,88	3,94	3,99	3,96	3,95	4,07	3,98	3,99
A1B0R2	4,16	4,00	3,92	3,91	3,80	3,96	3,92	3,93	4,05	3,95	3,97
A2B0R1	3,81	3,75	3,77	3,74	3,70	3,78	3,76	3,77	3,83	3,87	3,78
A2B0R2	3,85	3,83	3,73	3,77	3,78	3,85	3,88	3,80	3,85	3,86	3,85
A0B1R1	4,57	4,54	4,48	4,31	4,12	4,29	4,20	4,08	4,17	4,13	4,32
A0B1R2	4,63	4,64	4,47	4,36	4,24	4,42	4,34	4,34	4,35	4,37	4,43
A1B1R1	4,13	4,09	3,96	3,93	3,79	4,00	3,94	3,99	4,05	4,09	4,00
A1B1R2	4,12	4,12	4,09	4,00	4,01	4,03	4,01	4,00	3,99	3,98	4,04
A2B1R1	3,85	3,78	3,82	3,73	3,63	3,79	3,73	3,78	3,77	3,95	3,79
A2B1R2	3,90	3,82	3,81	3,72	3,80	3,83	3,79	3,82	3,81	3,95	3,83

Elaborado por: (Vallejo, 2023)

Tabla A5: Células por mililitro durante los días de fermentación para cada uno de los tratamientos

TRATAMIENTOS	DÍAS										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A0B0R1	3,15E+07	4,55E+07	9,50E+07	1,04E+08	7,70E+07	5,03E+07	4,43E+07	5,65E+07	2,35E+07	9,50E+06	6,50E+06
A0B0R2	3,15E+07	4,70E+07	7,15E+07	1,28E+08	1,14E+08	4,81E+07	4,20E+07	2,85E+07	1,20E+07	7,00E+06	9,00E+06
A1B0R1	3,15E+07	5,15E+07	1,85E+08	1,80E+08	1,09E+08	8,00E+07	7,20E+07	5,75E+07	5,20E+07	2,00E+07	2,90E+07
A1B0R2	3,15E+07	5,70E+07	2,63E+08	1,79E+08	1,36E+08	8,75E+07	7,70E+07	3,80E+07	4,65E+07	2,55E+07	2,30E+07
A0B0R1	3,15E+07	5,20E+07	1,79E+08	1,58E+08	1,04E+08	6,71E+07	5,82E+07	4,25E+07	2,60E+07	1,35E+07	1,05E+07
A2B0R2	3,15E+07	6,60E+07	1,94E+08	1,99E+08	1,63E+08	8,31E+07	7,25E+07	6,20E+07	2,25E+07	1,10E+07	1,45E+07
A0B1R1	3,15E+07	2,40E+07	2,50E+07	8,65E+07	5,80E+07	3,73E+07	3,58E+07	7,90E+07	1,10E+07	1,70E+07	1,20E+07
A0B1R2	3,15E+07	3,15E+07	1,58E+08	1,42E+08	1,38E+08	5,71E+07	4,76E+07	1,05E+07	7,50E+06	7,00E+06	1,35E+06
A1B1R1	3,15E+07	4,10E+07	2,01E+08	1,95E+08	1,93E+08	8,58E+07	7,67E+07	6,00E+07	3,50E+07	1,65E+07	1,80E+07
A1B1R2	3,15E+07	7,20E+07	2,26E+08	2,17E+08	4,90E+07	6,93E+07	5,69E+07	1,70E+07	1,05E+07	1,20E+07	8,00E+06
A2B1R1	3,15E+07	8,40E+07	2,18E+08	1,52E+08	5,40E+07	6,48E+07	5,48E+07	4,20E+07	2,20E+07	1,00E+07	6,00E+06
A2B1R2	3,15E+07	6,80E+07	2,49E+08	2,32E+08	1,49E+08	1,02E+08	1,03E+08	9,70E+07	2,05E+07	1,00E+07	1,20E+07

Elaborado por: (Vallejo, 2023)

Tabla. A6: Grado alcohólico (%) para cada uno de los tratamientos

TRATAMIENTO	RÉPLICA	DÍAS	
		0	10
A0B0	R1	0,00	9,00
A0B0	R2	0,00	10,00
A1B0	R1	0,00	8,00
A1B0	R2	0,00	8,00
A2B0	R1	0,00	7,00
A2B0	R2	0,00	6,00
A0B1	R1	0,00	6,00
A0B1	R2	0,00	6,00
A1B1	R1	0,00	7,00
A1B1	R2	0,00	7,00
A2B1	R1	0,00	7,00
A2B1	R2	0,00	7,00

Elaborado por: (Vallejo, 2023)

Tabla A7: Acidez volátil (g. ácido acético/L) para cada uno de los tratamientos

TRATAMIENTO	RÉPLICA	ACIDEZ VOLÁTIL
A0B0	R1	0,0735
A0B0	R2	0,4320
A1B0	R1	0,0135
A1B0	R2	0,0630
A2B0	R1	0,0578
A2B0	R2	0,0270
A0B1	R1	1,3965
A0B1	R2	1,2090
A1B1	R1	0,0360
A1B1	R2	0,7335
A2B1	R1	2,5275
A2B1	R2	0,0795

Elaborado por: (Vallejo, 2023)

Tabla A8: Ecuaciones de crecimiento de biomasa y velocidad máxima $\mu_{\text{máx.}}$ en la fase exponencial para cada tratamiento

Tratamiento	Réplica	Ecuaciones	$\mu_{\text{máx.}}$
A0B0	1	$0,0153X + 17,46$	0,0153
A0B0	2	$0,0179X + 17,16$	0,0179
A1B0	1	$0,0187X + 17,65$	0,0187
A1B0	2	$0,0226X + 17,56$	0,0226
A2B0	1	$0,0213X + 17,42$	0,0213
A2B0	2	$0,0241X + 17,49$	0,0241
A0B1	1	$0,0166X + 16,761$	0,0166
A0B1	2	$0,0221X + 17,273$	0,0221
A1B1	1	$0,0254X + 17,164$	0,0254
A1B1	2	$0,0317X + 17,327$	0,0317
A2B1	1	$0,041X + 16,708$	0,041
A2B1	2	$0,0208X + 17,801$	0,0208

Elaborado por: (Vallejo, 2023)

Tabla A9: Concentración de células de levadura (cel/ml)

Tratamientos	cel/ml
A0B0R1	1,04E+08
A0B0R2	1,14E+08
A1B0R1	1,44E+08
A1B0R2	1,57E+08
A2B0R1	1,31E+08
A2B0R2	1,81E+08
A0B1R1	7,23E+07
A0B1R2	1,40E+08
A1B1R1	1,93E+08
A1B1R2	2,17E+08
A2B1R1	1,52E+08
A2B1R2	1,90E+08

Elaborado por: (Vallejo, 2023)

Tabla A10: Cantidad de glucosa (g)

Densidad (g/L)	Glucosa inicial (g)	Glucosa Final (g)
1.0308	20,822	6,082
	20,410	5,669
	20,616	6,391
	21,028	6,391
	19,998	6,288
	20,925	6,288
	20,925	7,216
	20,616	6,391
	21,131	6,391
	20,616	5,979
	20,822	6,391
	20,925	6,494

Elaborado por: (Vallejo, 2023)

Tabla A11: Coeficientes de rendimiento de producción de biomasa ($Y_{M/S}$) y producción de etanol ($Y_{P/S}$)

Tratamientos	$Y_{M/S}$ (cel/g sustrato)	$Y_{P/S}$ (%)
A0B0R1	3,46E+06	61,06
A0B0R2	4,73E+06	67,84
A1B0R1	7,42E+06	56,24
A1B0R2	1,10E+07	54,65
A2B0R1	7,35E+06	51,06
A2B0R2	8,00E+06	40,99
A0B1R1	2,63E+06	43,76
A0B1R2	6,11E+06	42,18
A1B1R1	8,00E+06	47,49
A1B1R2	9,43E+06	47,82
A2B1R1	8,96E+06	48,51
A2B1R2	1,04E+07	48,51

Elaborado por: (Vallejo, 2023)

Tabla A12: Tiempos de Generación de todos los tratamientos

Tratamientos	Tiempo de generación (g)
A0B0R1	54,66
A0B0R2	40,48
A1B0R1	50,51
A1B0R2	36,28
A2B0R1	38,26
A2B0R2	30,65
A0B1R1	54,91
A0B1R2	40,80
A1B1R1	30,06
A1B1R2	23,12
A2B1R1	15,02
A2B1R2	41,72

Elaborado por: (Vallejo, 2023)

B. Resultados Estadísticos

Tabla B1: ANOVA de la variable °Brix al final de la fermentación

Variables	S.C.	G.L.	C.M.	F.C.	Probabilidad
A: concentración de zumos	0,195	2	0,097	0,382	0,698 (ns)
B: Tipos de levadura	0,653	1	0,653	2,562	0,161 (ns)
A x B	1,512	2	0,756	2,964	0,127 (ns)
Error	1,530	6	0,255		
Total	3,890	11			

$R^2 = 0,607$ (R^2 ajustada = 0,279)

(*) = Significativo (ns) = no significativo

Tabla B2: ANOVA de la variable pH al final de la fermentación

Variables	S.C.	G.L.	C.M.	F.C.	Probabilidad
A: concentración de zumos	0,669	2	0,334	62,023	0,000 (*)
B: Tipos de levadura	0,000	1	0,000	0,039	0,951 (ns)
A x B	0,002	2	0,001	0,141	0,872 (ns)
Error	0,32	6	0,005		
Total	0,703	11			

$R^2 = 0,954$ (R^2 ajustada = 0,916)

(*) = Significativo (ns) = no significativo

Tabla B3: Subconjuntos homogéneos del factor A de la variable pH

Concentración de zumos	N	Subconjunto		
		1	2	3
25:75 cidra-mandarina	4	3,81250		
50:50 cidra-mandarina	4		4,00000	
75:25 cidra-mandarina	4			4,38000
Sig.		1,000	1,000	1,000

El término de error es la media cuadrática(Error) = ,005.

Tabla B4: ANOVA de la variable Acidez Total al final de la fermentación

Variables	S.C.	G.L.	C.M.	F.C.	Probabilidad
A: concentración de zumos	26,143	2	13,071	10,525	0,011 (*)
B: Tipos de levadura	0,132	1	0,132	0,107	0,755 (ns)
A x B	2,637	2	1,319	1,062	0,403 (ns)
Error	7,452	6	1,242		
Total	36,364	11			

$R^2 = 0,795$ (R^2 ajustada = 0,624)

(*) = Significativo (ns) = no significativo

Tabla B5: Subconjuntos homogéneos del factor A de la variable acidez

Concentración Zumos	N	Subconjunto	
		1	2
75:25 cidra mandarina	4	4,0625	
50:50 cidra mandarina	4	5,2200	5,2200
25:75 cidra mandarina	4		7,6075
Sig.		,368	,052

El término de error es la media cuadrática (Error) = 1,242.

Tabla B6: ANOVA de la variable cel/ml al final de la fermentación

Variables	S.C.	G.L.	C.M.	F.C.	Probabilidad
A: concentración de zumos	3,201x10 ¹⁴	2	1,600x10 ¹⁴	6,242	0,034 (*)
B: Tipos de levadura	1,030x10 ¹⁴	1	1,030x10 ¹⁴	4,016	0,092 (ns)
A x B	7,945x10 ¹³	2	3,972x10 ¹³	1,549	0,287 (ns)
Error	1,538x10 ¹⁴	6	2,564x10 ¹³		
Total	6,563x10 ¹⁴	11			

R² = 0,766 (R² ajustada = 0,570)

(*) = Significativo (ns) = no significativo

Tabla B7: Subconjuntos homogéneos del factor A de la variable cel/ml

Concentración de zumos	N	Subconjunto	
		1	2
75:25 cidra-mandarina	4	7,2E+06	
25:75 cidra-mandarina	4	1,7E+07	1,07E+07
50:50 cidra-mandarina	4		1,95E+07
Sig.		,610	,110

El término de error es la media cuadrática (Error) = 2,5E+13

Tabla B8: ANOVA de la variable Alcohol

Variables	S.C.	G.L.	C.M.	F.C.	Probabilidad
A: concentración de zumos	2,167	2	1,083	6,500	0,031 (*)
B: Tipos de levadura	5,333	1	5,333	32,400	0,001 (*)
(A)(B)	8,167	2	4,083	24,500	0,001 (*)
Error	1,00	6	0,167		
Total	16,667	11			

$R^2 = 0,940$ (R^2 ajustada = 0,890)

(*) = Significativo (ns) = no significativo

Tabla B9: Subconjuntos homogéneos del factor A

Concentración de zumos	N	Subconjunto	
		1	2
75: 25: cidra-mandarina	4	6,7500	
50:50 cidra-mandarina	4	7,5000	7,5000
25:75 cidra-mandarina	4		7,7500
Sig.		,090	,679

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,167.

Tabla B10: ANOVA de variable Acidez Volátil

Variables	S.C.	G.L.	C.M.	F.C.	Probabilidad
A: concentración de zumos	0,726	2	0,363	0,655	0,553 (ns)
B: Tipos de levadura	2,453	1	2,354	4,251	0,085 (ns)
(A)(B)	0,459	2	0,229	0,414	0,679 (ns)
Error	3,32	6	0,554		
Total	6,862	11			

(*) = Significativo (ns) = no significativo

C. Cálculos

Tabla C1: Ajuste de °Brix inicial

$$P1.C1 + P2.C2 = PT.CT$$

$$(2\text{kg})(5.65^\circ\text{Brix}) + (X\text{Kg})(100^\circ\text{Brix}) = (2\text{Kg} + X) (20^\circ\text{Brix})$$

$$11.3 + 100X = 40 + 20 X$$

$$80X = 28,7$$

$$X = 0,358 \text{ Kg}$$

Tratamientos	Ajuste de azúcar en los mostos (Kg)
A0B0R1	0,358
A0B0R2	0,354
A1B0R1	0,310
A1B0R2	0,310
A2B0R1	0,260
A2B0R2	0,253
A0B1R1	0,356
A0B1R2	0,353
A1B1R1	0,311
A1B1R2	0,308
A2B1R1	0,246
A2B1R2	0,273

Elaborado por: (Vallejo, 2023)

D. Gráficos y figuras

Gráfico D1: Crecimiento del logaritmo de biomasa y reducción de sólidos solubles (°Brix) de *S. cerevisiae* en mosto 75:25 cidra-mandarina, tratamiento A₀B₀R₁.

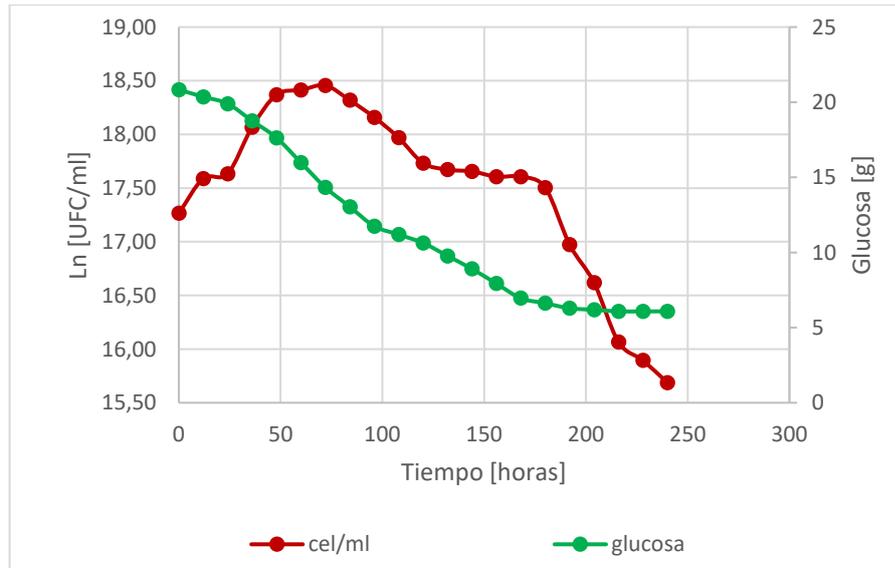


Gráfico D2: Crecimiento del logaritmo de biomasa y reducción de sólidos solubles (°Brix) de *S. cerevisiae* en mosto 75:25 cidra-mandarina, tratamiento A₀B₀R₂.

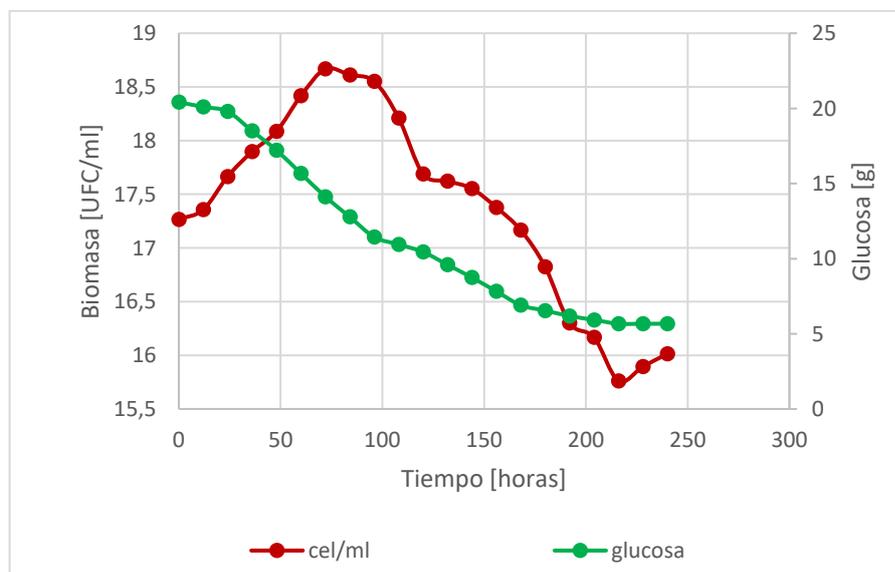


Gráfico D3: Crecimiento del logaritmo de biomasa y reducción de sólidos solubles (°Brix) de *S. cerevisiae* en mosto 50:50 cidra-mandarina, tratamiento A₁B₀R₁.

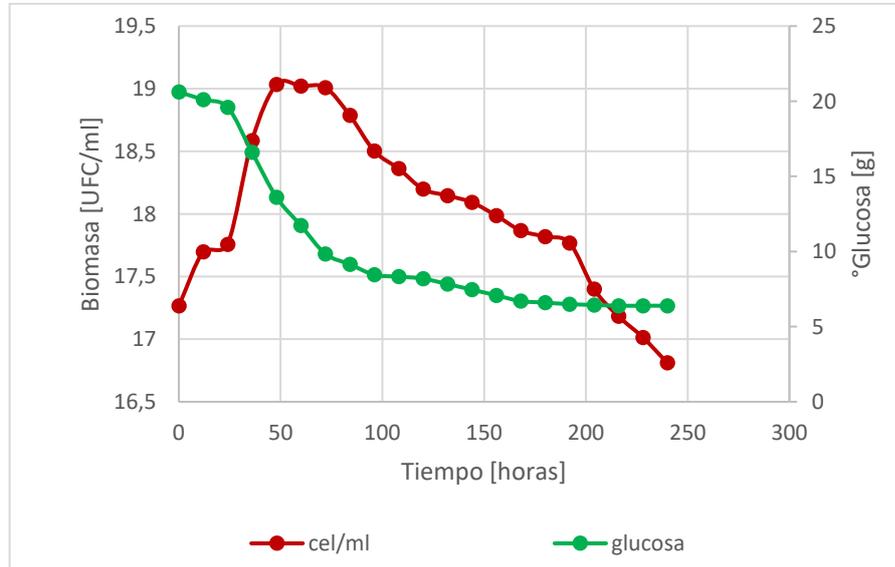


Gráfico D4: Crecimiento del logaritmo de biomasa y reducción de sólidos solubles (°Brix) de *S. cerevisiae* en mosto 50:50 cidra-mandarina, tratamiento A₁B₀R₂.

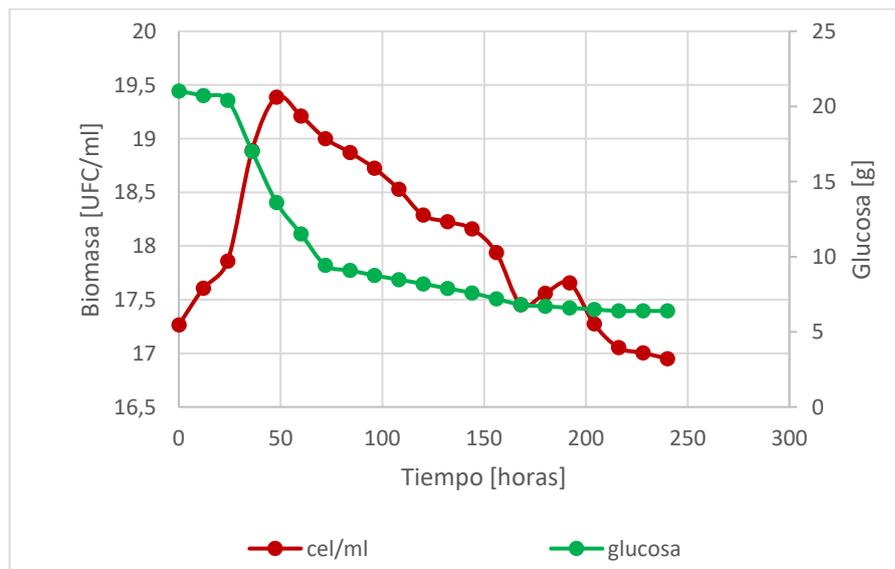


Gráfico D5: Crecimiento del logaritmo de biomasa y reducción de sólidos solubles (°Brix) de *S. cerevisiae* en mosto 25:75 cidra-mandarina, tratamiento A₂B₀R₁.

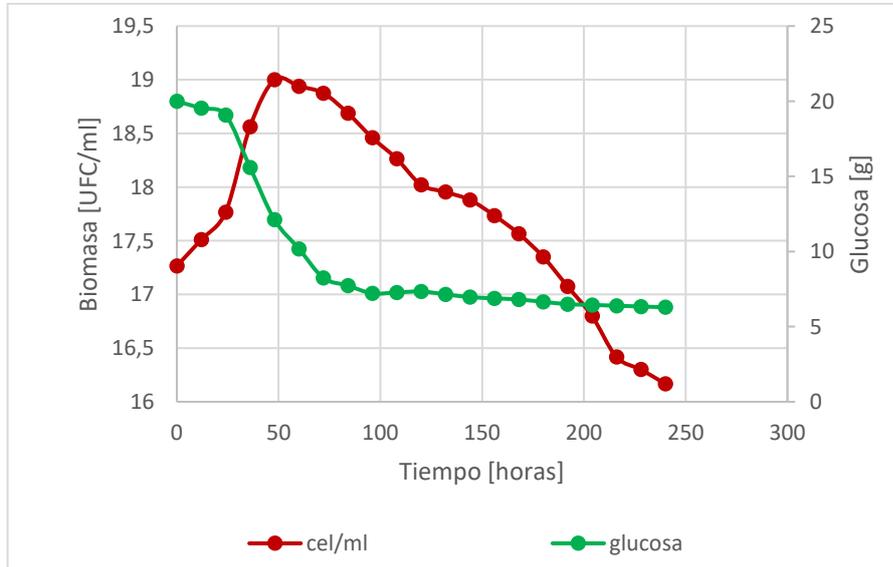


Gráfico D6: Crecimiento del logaritmo de biomasa y reducción de sólidos solubles (°Brix) de *S. cerevisiae* en mosto 25:75 cidra-mandarina, tratamiento A₂B₀R₂.

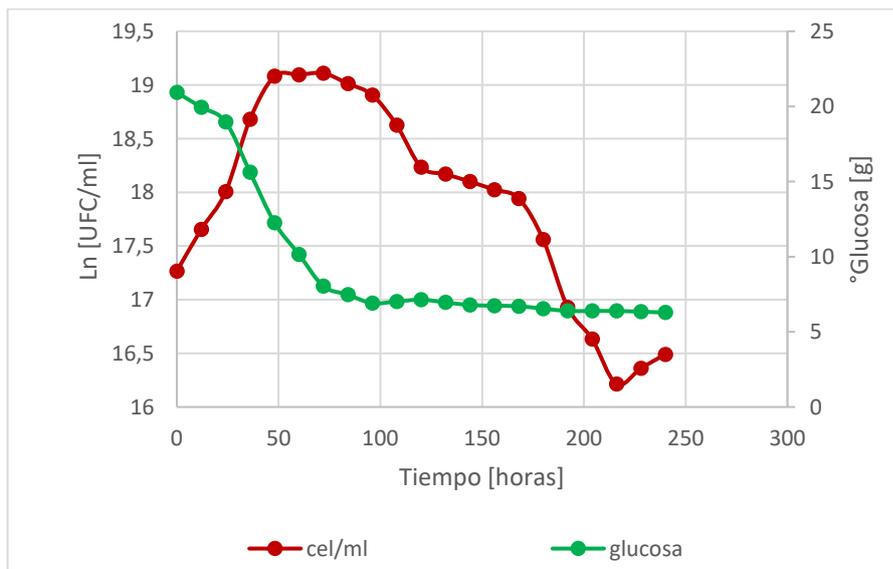


Gráfico D7: Crecimiento del logaritmo de biomasa y reducción de sólidos solubles (°Brix) de *S. bayanus* en mosto 75:25 cidra-mandarina, tratamiento A₀B₁R₁.

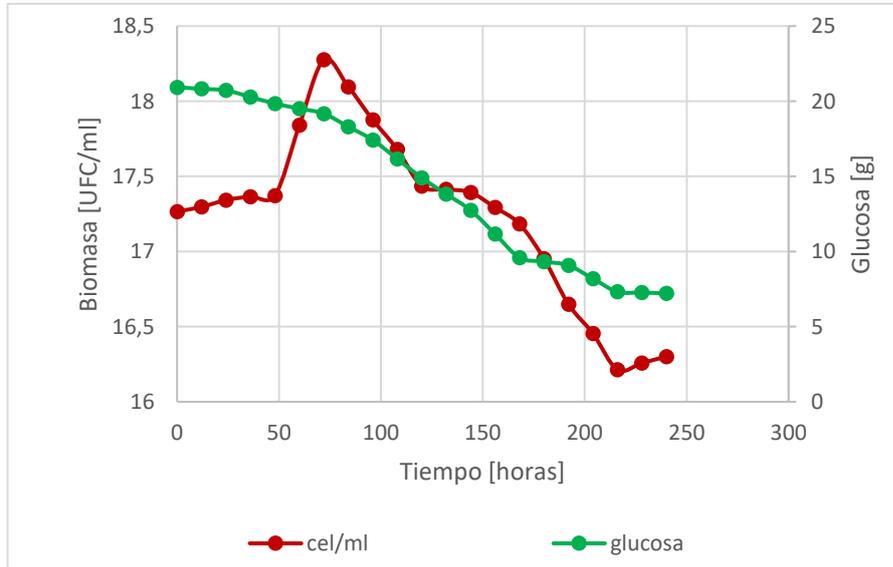


Gráfico D8: Crecimiento del logaritmo de biomasa y reducción de sólidos solubles (°Brix) de *S. bayanus* en mosto 75:25 cidra-mandarina, tratamiento A₀B₁R₂.

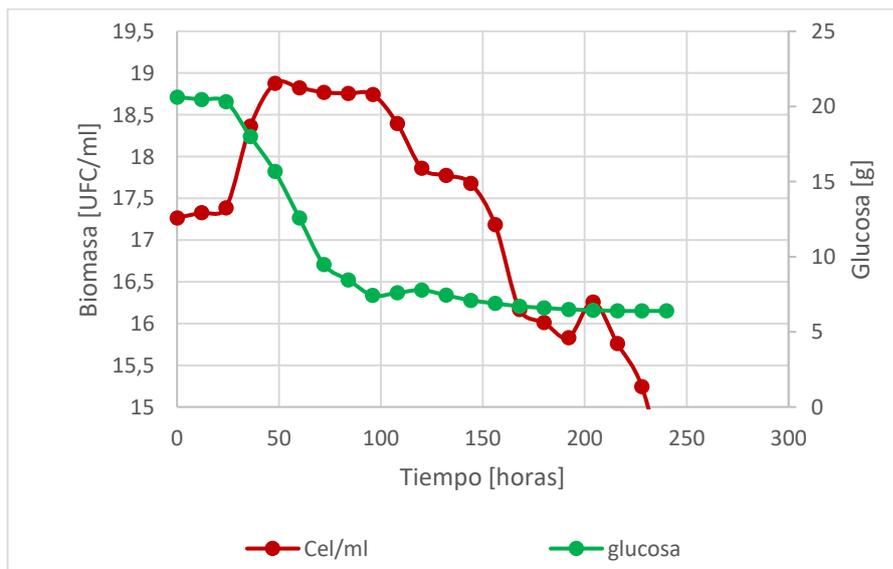


Gráfico D9: Crecimiento del logaritmo de biomasa y reducción de sólidos solubles (°Brix) de *S. bayanus* en mosto 50:50 cidra-mandarina, tratamiento A₁B₁R₁.

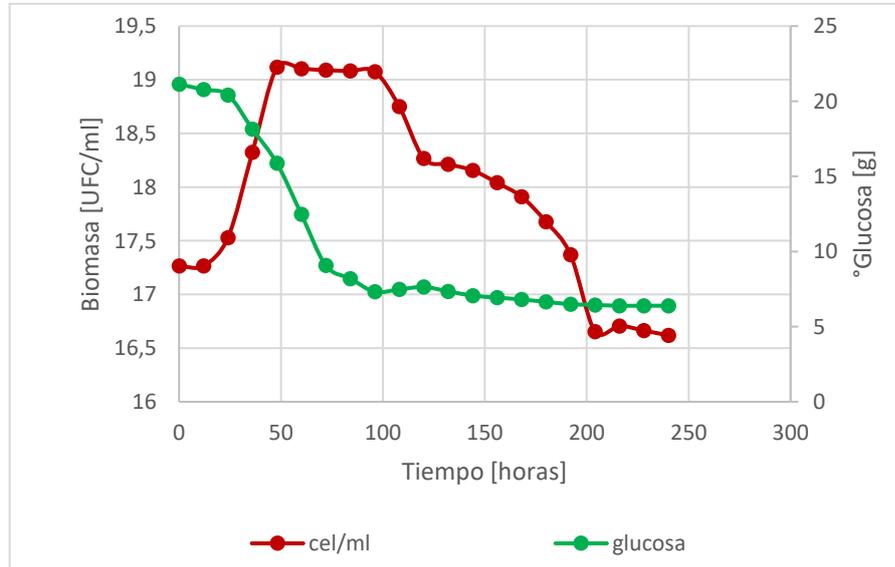


Gráfico D10: Crecimiento del logaritmo de biomasa y reducción de sólidos solubles (°Brix) de *S. bayanus* en mosto 50:50 cidra-mandarina, tratamiento A₁B₁R₂.

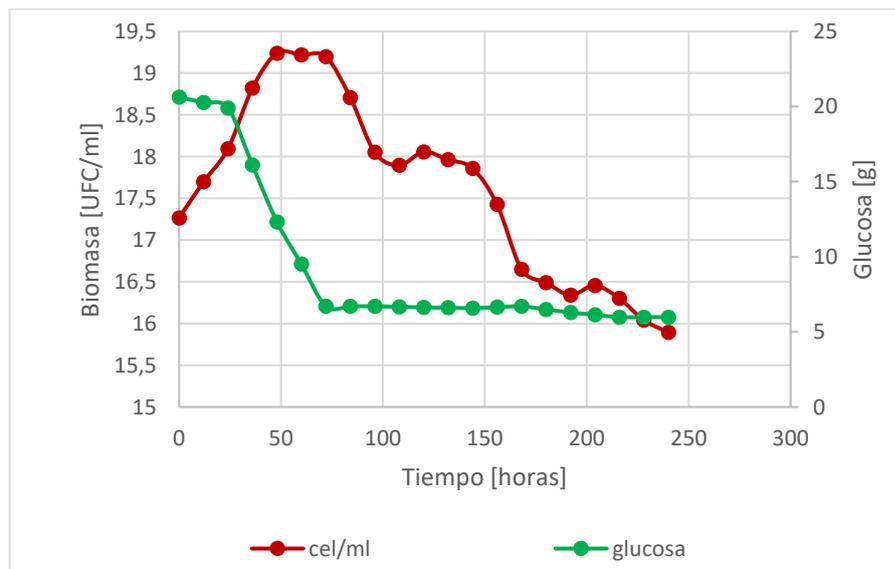


Gráfico D11: Crecimiento del logaritmo de biomasa y reducción de sólidos solubles (°Brix) de *S. bayanus* en mosto 25:75 cidra-mandarina, tratamiento A₂B₁R₁.

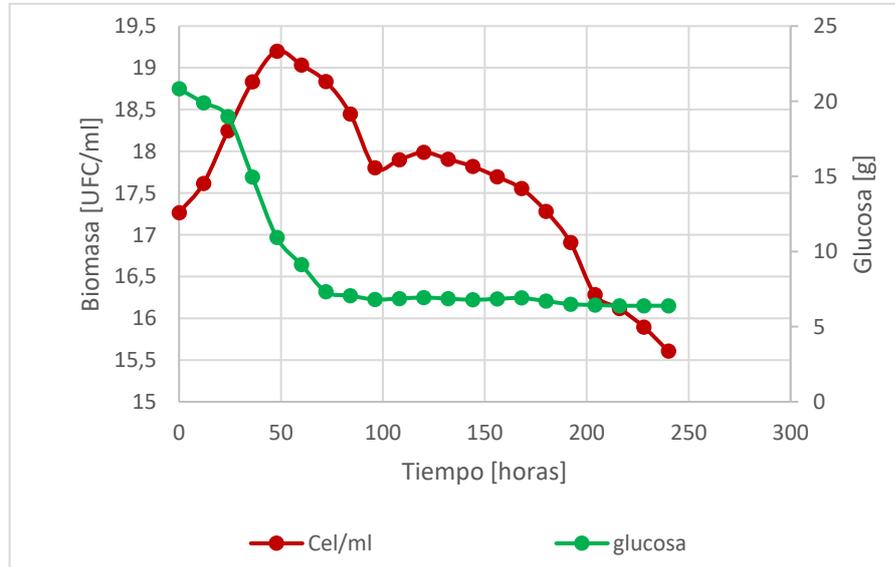


Gráfico D12: Crecimiento del logaritmo de biomasa y reducción de sólidos solubles (°Brix) de *S. bayanus* en mosto 25:75 cidra-mandarina, tratamiento A₂B₁R₂.

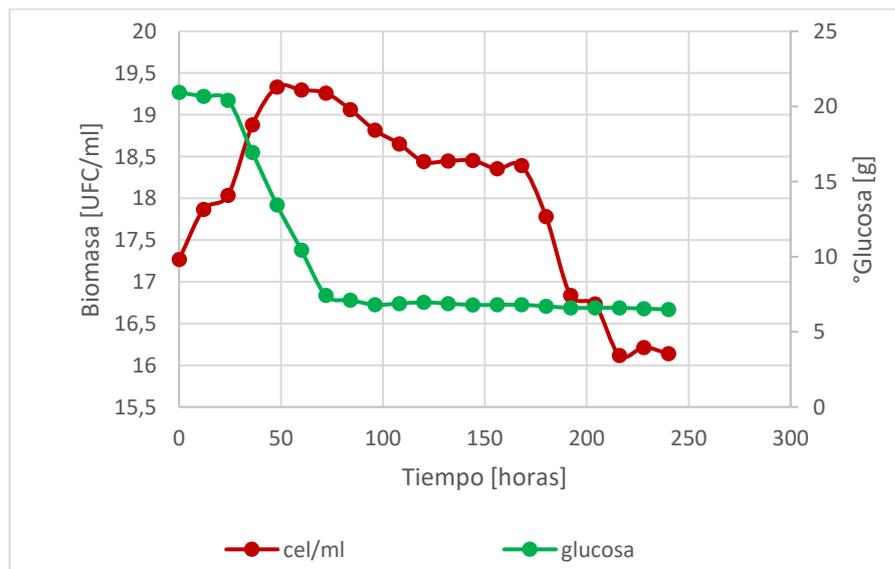




Figura D1: Obtención de materias primas (mandarina y cidra)



Figura D2: Airlock



Figura D3: Caracterización fisicoquímica de zumo de mandarina y cidra



Figura D4: Mostos preparados



Figura D5: Activación de levaduras



Figura D6: Reposo de mostos y recolección diaria de muestras



Figura D7: Conteo de levaduras a diario

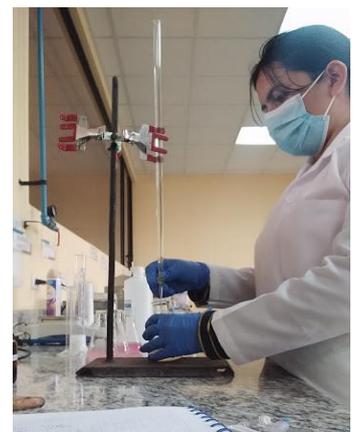


Figura D8: Análisis fisicoquímico de mostos a diario



Figura D9: Esterilización de botellas



Figura D10: Pasteurización lenta de las bebidas fermentadas



Figura D11: Bebida embotellada y etiquetada



Figura D12: Destilación alcohólica



Figura D13: Determinación de grado alcohólico



Figura D14: Equipo para destilación con arrastre de vapor para determinación de acidez volátil

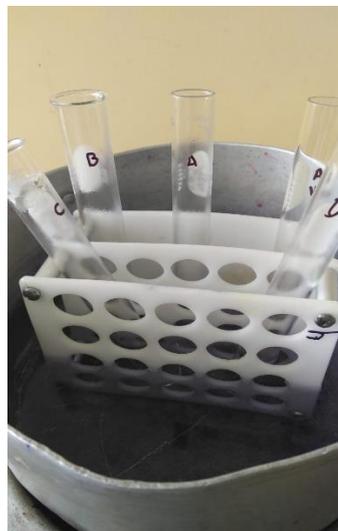


Figura D15: Prueba cualitativa para metanol



Figura D16: Prueba negativa de presencia metanol, tratamiento A₀B₀R₁



Figura D17: Prueba positiva de presencia metanol, tratamiento $A_0B_0R_2$



Figura D18: Prueba positiva de presencia metanol, tratamiento $A_1B_0R_1$



Figura D19: Prueba negativa de presencia metanol, tratamiento $A_1B_0R_2$